SYNTHESEN VON PEPTIDTEIL-MODIFIZIERTEN ACTINOMYCINEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Eckhard Schäfer
aus Lauenburg (Pommern)

Göttingen 1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0004

SYNTHESEN VON PEPTIDTEIL-MODIFIZIERTEN ACTINOMYCINEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Eckhard Schäfer
aus Lauenburg (Pommern)

Göttingen 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Privat-Dozent Dr. H. Lackner

Korreferent: Prof. Dr. Dr. e.h. H. Brockmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 1975

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von Januar 1972 bis Dezember 1974 unter der Leitung von Herrn Privat-Doz. Dr. H. Lackner durchgeführt.

Ich danke Herrn Privat-Doz. Dr. H. Lackner für die interessante Aufgabenstellung und Herrn Prof. Dr. Dr. e.h. Brockmann für die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
II.	Synthese der beiden (α,ß)-stellungsisomeren (na,enantio)-Actinomycine C_1 (2,3)	12
1.	Aufbau von N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester (4d)	15
1.1.	Darstellung von N-Methyl-L-valin-tert.-butylester	15
1.2.	Aufbau des Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosins (25)	18
1.3.	Verlängerung des Z-Tripeptids 25 zum N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptid-ester 34(=4d)	22
2.	(α_{na},ß-enantio)- und ($ß_{na}$,α-enantio)-Actinomycin C_1	25
2.1.	Oxidative Mischkondensation von 4c und 5a zu den Actinomycinsäure-mono-lacton-tert.-butylestern 7b,8b	25
2.2.	Identifizierung der aus den Zellulosesäule-zonen 1-5 isolierten Substanzen	29
2.3.	Abspaltung der tert.-Butylgruppen	34
2.4.	Die Lactonisierung des (na,enantio)-Actinomycin C_1-säure-(α)-lactons 7a und der Actinomycin C_1-säure	37

Seite

III. Synthesewege zu einem zweifach überbrückten (CC)-Actinomycin (Abb. 10) sowie zu den Actinomycinen $X_{o\beta}$, i-$X_{o\beta}$ und (3'$_{\alpha,\beta}$-Hyp)-actinomycin C_1 43

1. Aufbau von N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-O_{Thr}-[benzyloxycarbonyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl]-L-threonyl-D-valyl-4-hydroxy-L-prolin (37b) 46

1.1. Versuche zur Maskierung von 4-Hydroxyprolin 47

1.2. Synthese von D-Valyl-(O-tert.-butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (59) 49

1.3. Aufbau des Depsipeptids 58 54

1.4. Kondensation der Fragmente 58 und 59, Abspaltung der tert.-Butylgruppen und Kupplung des Pentapeptids 61 mit der Actinocinvorstufe 64 zu 65 62

2.1. Oxidative Mischkondensation der beiden Pentapeptid-Derivate 36 und 37a 69

2.2. Cyclisierungsversuche zu Actinomycin $X_{o\beta}$ und 8-Deutero-actinomycin i-$X_{o\beta}$ 74

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse 79

V. Beschreibung der Versuche 83

VI. Literaturverzeichnis 124

I. Einleitung und Aufgabenstellung

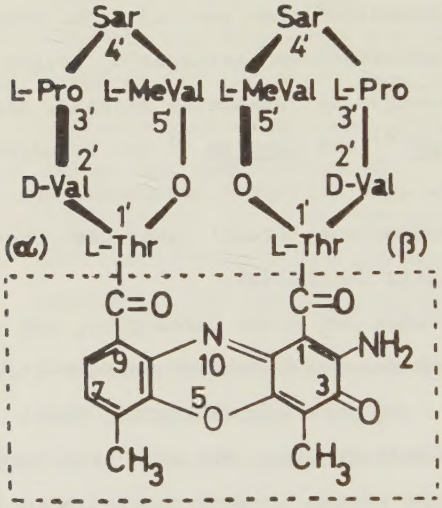
Die roten, gut kristallisierenden Actinomycine sind Stoffwechselprodukte von Streptomyceten-Stämmen; ihr erster Vertreter, das Actinomycin A, wurde 1940 von Waksman und Woodruff [1] als erstes kristallisiertes Antibiotikum überhaupt isoliert. Neben der hohen antibiotischen Wirksamkeit, die noch bei Konzentrationen von 0.1 µg/ml eine Wachstumshemmung von Mikroorganismen verursacht, zeigen Actinomycine eine ausgeprägte cytostatische Wirkung, die bereits 1952 von Hackmann [2] und Schulte [3] bei Versuchen an Tieren erkannt wurde. Auch seltenere Tumorarten des Menschen wie Lymphogranulomatose, Wilms' Tumor oder Chorioncarcinom werden günstig beeinflußt.

Actinomycine (1) bestehen aus einem Chromophor, der 2-Amino-4.6-dimethyl-phenoxazinon-(3)-dicarbonsäure-(1.9) - Actinocin [4] genannt - und zwei säureamidartig damit verknüpften Pentapeptidlactongruppen; sie sind also Chromopeptide. Die Peptidringe können entweder gleich (iso-) oder verschieden sein (aniso-Actinomycine) und werden entsprechend ihrer Stellung am aromatischen oder chinoiden Ring des Actinocins - in 1 eingerahmt - mit (α) bzw. (ß) bezeichnet. Die etwa dreißig bisher isolierten nativen Actinomycine unterscheiden sich in der Aminosäurezusammensetzung der Peptidlactongruppen. Die meistuntersuchten Vertreter sind Actinomycin C_1(D)*) (1a) und C_3 (1c) mit

---

*) Actinomycin "D" ist die in der angelsächsischen Literatur benutzte Bezeichnung.

D-Valin bzw. D-allo-Isoleucin als Aminosäure 2'$_\alpha$ und 2'$_\beta$. Nachdem Brockmann und Lackner auf mehreren Wegen die Totalsynthese der Actinomycine C_1, C_2 (1b) und C_3 gelungen war, wurde eine Reihe von sowohl am Chromophor [5-8] wie auch im Peptidteil [9-15] abgewandelten Actinomycinen zugänglich.



1a: Actinomycin C_1(D)

b: D-alle statt D-Val in 2'$_\beta$: Actinomycin C_2

c: D-alle statt D-Val in 2'$_\alpha$ und 2'$_\beta$: Actinomycin C_3

Die Actinomycine entfalten ihre biologische Wirkung dadurch, daß sie in vivo im Zellkern angereichert werden und mit den doppelt-helikalen Desoxyribonucleinsäuren(DNA) spezifische Komplexe bilden. Dabei kommt es nach Müller und Crothers [16], deren Vorstellungen durch die kürzlich erfolgten röntgenanalytischen Untersuchungen von Jain und Sobell [17] gestützt werden, zu einem Einschub des ebenen

Actinomycin-Chromophors zwischen die Guanin/Cytosin-Basen der DNA ("Intercalation"-Modell, vgl. Abb. 1). Die Peptidringe werden über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen an die Helixoberfläche (vermutlich in der kleinen Furche) gebunden. Die so eingeschobenen

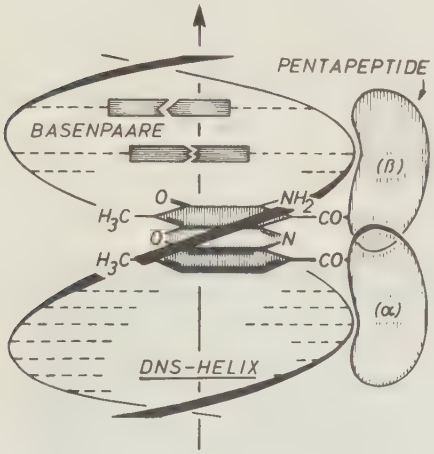


Abbildung 1: Einschub eines Actinomycin-Moleküls zwischen die Basen einer Desoxyribonucleinsäure (Doppelhelix).

Actinomycin-Moleküle verzerren bzw. blockieren die DNA-Doppelhelix und behindern dadurch die entlang der DNA-Matrize erfolgende Synthese von Ribonucleinsäuren ("Transskription") und damit auch den Aufbau der Zellproteine. Änderungen des Actinomycin-Chromophors, etwa in den Substituenten von C-4, C-6 [6] oder C-2, C-7 [18,19] beeinflussen die Ausbildung des DNA-Komplexes erheblich. Der Austausch der 4,6-Methylgruppen gegen Methoxyl oder der 2-Aminofunktion gegen Hydroxyl oder Chlor führt beispielsweise zu einem weitgehenden bzw. völligen Verlust der an-

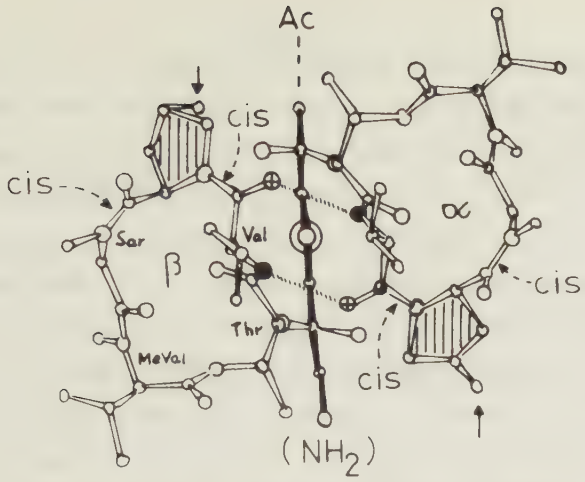
tibiotischen Wirksamkeit der Moleküle.

Strukturabweichungen in den Peptidringen wirken sich, solange die Lactonstruktur, die natürliche Konfigurationssequenz LDL-L (vgl. 1) und bestimmte Grundformen der Aminosäuren nicht angetastet werden, weniger gravierend aus (natürliche Strukturvarianten). ^{1}H- und ^{13}C-Kernresonanz-Messungen [20] haben gezeigt, daß sich in diesen Fällen auch die Gesamtkonformation, d.h. der Raumstrukturtyp des Actinomycin-Moleküls nicht wesentlich ändert.

Die Raumstruktur des Actinomycin C_1-Moleküls in einem kristallisierten Actinomycin/Desoxyguanosin (1:2)-Komplex konnten vor einiger Zeit Sobell, Jain, Sakore und Nordmann[21] röntgenanalytisch ermitteln. Danach ist das gesamte Molekül pseudo-C_2-symmetrisch (Symmetrieachse durch O-5 und N-10 des Chromophors; vgl. 1 und Abb. 2a ⓞ). Beide Peptidlactongruppen haben gleichartige Konformationen mit cis-Amidbindungen zwischen den Val-Pro- und Pro-Sar-Resten (cis~~) und sind beiderseits der Chromophorebene (Abb. 2a, Ac) quasi "liegend" angeordnet. Zwischen den NH- (●) und CO-Gruppen (●) der (α)- und (ß)-Valinreste sind wechselseitig zwei feste (α,ß)-interannulare, konformationsstabilisierende Wasserstoffbrücken ausgebildet. Die Gesamtraumstruktur zeigt das CPK-Kalottenmodell in Abb. 2b.

Wie sich nach diesen röntgenanalytischen Studien das Actinomycin C_1 von hinten zwischen die Guanin/Cytosin-Basenpaare einer DNA-Doppelhelix einlagert, ist in Abb. 3 skizziert. Anhand des Modells wird verständlich, daß so-

a



b

Abb. 2a: Dreidimensionale Projektion der Konformation von Actinomycin C_1 nach einer Röntgenstrukturanalyse von Sobell et. al.[21] mit zusätzlich eingezeichneten Hydroxygruppen (↑) in 4-Stellung der Prolinringe. Ac: Ebene des Actinocinylrestes mit Symmetrieachse durch N-10, O-5 (⊙); cis⇢: cis-Amidbindungen.

b: CPK-Kalottenmodell des an C-8 deuterierten (3'$\alpha\beta$-Hydroxyprolin)-actinomycin C_1. Unten: Chromophor, links: ß-Peptidring mit der 4-OH-Gruppe (oben) des Hydroxyprolyls, rechts oben: α- Peptidring.

wohl die Struktur des Chromophors (Ac) als auch die der beiden Peptidringe nicht wesentlich gestört sein dürfen, wenn sich der Komplex stabil ausbilden soll. Gravierende Abweichungen in der Raumstruktur des Peptidteils z.B. verhindern das "Einrasten" der Wasserstoffbrücken (----) zwischen dem Actinomycin und den DNA-Basen. Ein Hauptziel dieser Arbeit war, einige Modellactinomycine mit stark - möglicherweise reversibel - veränderter Raumstruktur zu synthetisieren und an diesen die Peptidringkonformation, die Wechselwirkung zwischen den Peptidlactongruppen (H-Brücken) sowie das davon abhängige biologische Verhalten zu studieren.

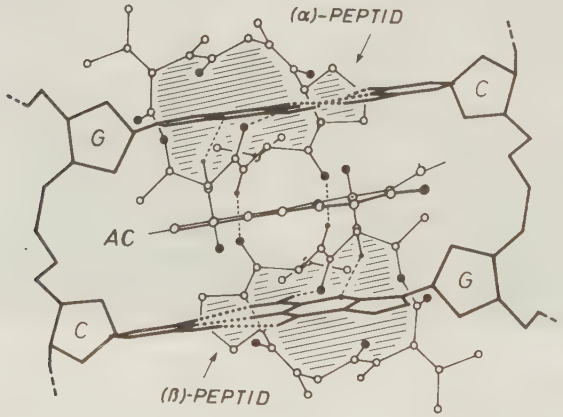


Abbildung 3: Einschub des Actinomycin C_1-Moleküls zwischen zwei Guanin/Cytosin-Basenpaare der DNA-Doppelhelix (gezeichnet nach SOBELL et. al.).
G: Desoxyguanosyl-, C: Desoxycytidylrest.
Ac: Actinocinylgruppe von den 4- und 6-Methylresten her gesehen. • Sauerstoffatome des Actinomycins.--- Wasserstoffbrücken.

Wie nämlich detaillierte ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Studien [22] zeigten, ist die Konformation eines isolierten Peptidlactonringes (Abb. 4a,b) keineswegs stabil. In Lösungsmitteln wie Chloroform oder Benzol liegt der sog. "C"-Typ [23] mit all-trans-Amidbindungen und einer transannularen H-Brücke (Abb. 4b) vor. Ein Wechsel zu H-brücken-akzeptierenden Solventien wie Aceton, Methanol (Wasser) etc. läßt die Konformation in den "A"-Typ (Abb. 4a) mit zwei cis-Amidbindungen und über dem Chromophor quasi "liegend" angeordneter Peptidringebene umklappen. Beim Übergang in das Actinomycin (Abb. 4c) wird nur der "A"-Typ übernommen und dort durch

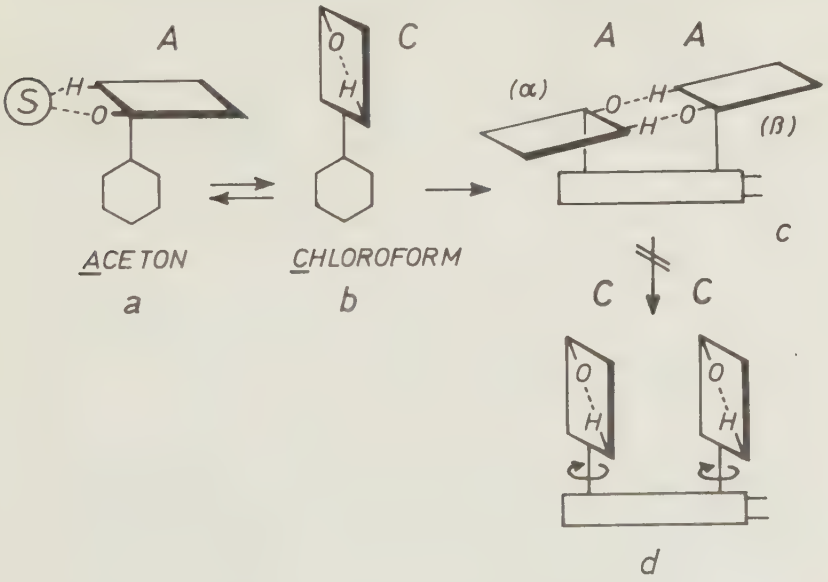
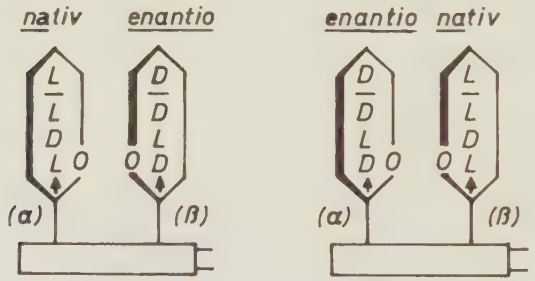


Abbildung 4: Die solvensabhängigen Konformationen der Pentapeptidlactongruppen (A,C) und die Stabilisierung des Typs A im Actinomycin-Molekül durch zwei (α,ß)-interannulare Wasserstoffbrücken. (S: Wasserstoffbrückenacceptor-Solvens, ▭ Peptidlactonringe, ▭ Chromophor des Actinomycins).

die beiden (α,ß)-interannularen H-Brücken, die Klammerwirkung des Chromophors u. dgl. stabilisiert. Dabei entsteht ein sehr fester und für alle wirksamen Actinomycine praktisch einheitlicher Raumstrukturtyp. Die am gelösten Actinomycin C_1 erhaltenen NMR-Befunde sind mit den röntgenanalytisch am Komplexkristall ermittelten Daten konsistent, d.h. auch in Lösung liegen die Actinomycine wahrscheinlich in der in Abb. 3 skizzierten Raumstruktur vor.



2 3

(α_{na},ß-enantio)-Actinomycin C_1; (α-enantio,$ß_{na}$)-Actinomycin C_1

(⟶ Konfigurationssequenz, Aminosäuren: vgl. 1).

Da bekannt war, daß die zu Actinomycin C_1 (1) spiegelbildliche Verbindung, das enantio-Actinomycin C_1, bakteriostatisch unwirksam ist, war das nächste Syntheseziel ein Actinomycin mit einem nativen und einem dazu enantiomeren Peptidring. Hierbei gibt es je nach Verknüpfung der Peptidgruppe in (α) oder (ß)-Stellung des Chromophors zwei Stellungsisomere (2, 3), die zueinander wiederum

spiegelbildlich sind und getrennt aufgebaut werden sollten. In diesem Isomerenpaar würden sich die konformationsstabilisierenden (α,ß)-interannularen H-Brücken (Abb. 4c) aus sterischen Gründen kaum noch ausbilden und man konnte hoffen, ein Actinomycin mit zwei - wenngleich enantiomeren - C-Typ-Peptidringen (Abb. 4d) zu erhalten. Da freie Peptid-Enantiomerenpaare häufig zur Assoziation neigen, würde sich dieses CC-Typ-Actinomycin möglicherweise sogar selbst stabilisieren, was dann z.B. aus den NMR-Messungen hervorgehen sollte. Neben den konformativen Daten interessierten natürlich Komplexbildungstendenz mit DNA, die biologische Wirksamkeit und, aufgrund der merkwürdigen Strukturverhältnisse, auch die übrigen Moleküleigenschaften.

Eine weitere Möglichkeit zum Aufbau eines "konformativ gestörten" CC-Typ-Actinomycins - in diesem Falle mit zwei gleichartigen (α)- und (ß)-Peptidgruppen - bestand darin, das "Herunterklappen" der Peptidringe und die Ausbildung der AA-Konformation (Abb. 4c) durch eine zusätzliche Verbrückung der Peptidlactongruppen im Sinne von Abb. 5a→b→c zu verhindern. Für diesen Plan sprachen gewichtige Vorteile: 1.) Die beiden Peptidringe konnten gleichartig und in ihrer Zusammensetzung analog den in nativen Actinomycinen (1) vorkommenden gewählt werden, was Studien der Konformation und der Peptid/Peptid-Wechselwirkung u.U. sehr erleichtert. 2.) Als günstiger Anknüpfungspunkt für die zusätzliche Brücke bot sich die Hydroxylfunktion von 4-Hydroxyprolin an, denn natürliche Actinomycine mit 4-Hydroxyprolin an-

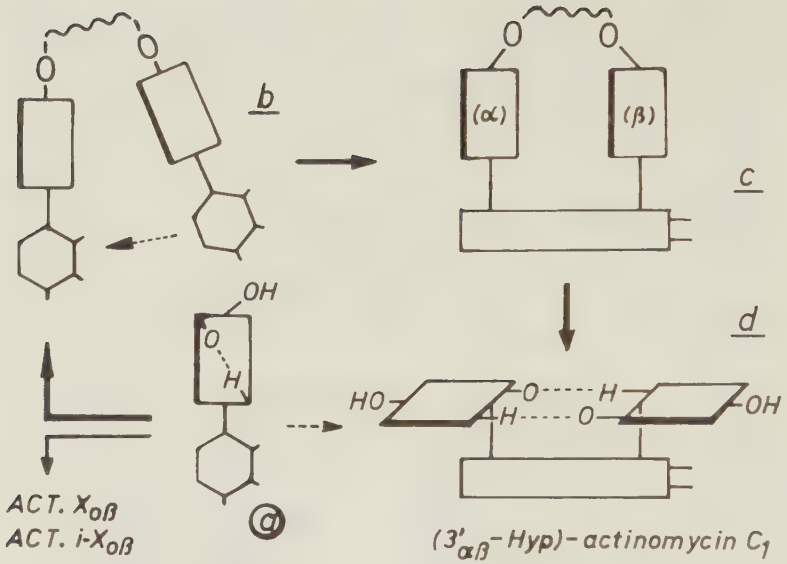


Abbildung 5: Verknüpfung von zwei Pentapeptidlacton-Derivaten (a) durch eine Peptid/Peptid-Brücke (b) mit nachfolgender Umwandlung in ein Actinomycin mit zwei C-Typ-Peptid-ringen (⬡ Chromophor-Vorstufen, ▭ Actinocinylrest).

statt Prolin in einer Peptidkette (ß) waren bekannt. 3.) Das "gestörte" und vermutlich unwirksame CC-Typ-Actinomycin ließe sich durch Aufbrechen der oberen Brücke in ein normales, wahrscheinlich wirksames AA-Typ-Actinomycin (Abb. 5c → d) umwandeln. 4.) Bei dieser Synthese würden als Nebenprodukte das natürliche Actinomycin $X_{oß}$ [24-27] (41)

und das bisher nicht aufgefundene (α,ß)-stellungsisomere Actinomycin i-$X_{o\beta}$ (42) anfallen, beide hinsichtlich eines synthetischen Strukturbeweises und ihrer bakteriostatischen Eigenschaften von Interesse.

Falls sich bei den sicher sehr schwierigen Synthesen ergeben würde, daß eine solche zusätzliche Peptid/Peptid-Überbrückung - zunächst vielleicht mit Hilfe von Dicarbonsäuren bestimmter Länge - möglich ist, müßte man sehr viel leichter, möglicherweise enzymatisch oder mit Licht abspaltbare bifunktionelle Brückenelemente entwickeln. Dann könnten Überlegungen dahin gehen, das infolge der "falschen" Konformation vermutlich unwirksame und damit wenig toxische CC-Typ-Actinomycin einem Organismus zuzuführen und es gezielt am Wirkungsort durch Lösen der zusätzlichen Brücke in das dann biologisch aktive AA-Typ-Konformere umzuwandeln.

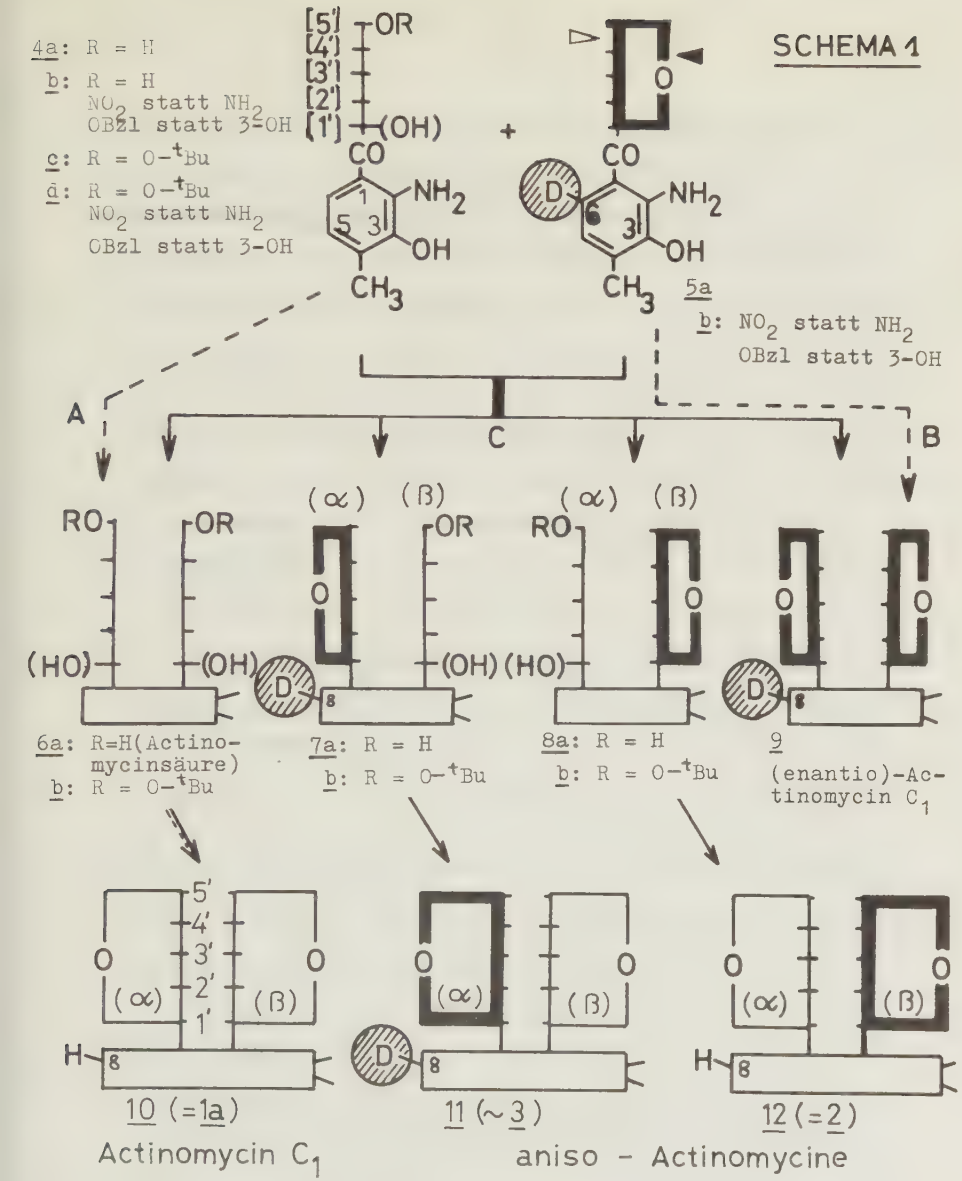
II. Synthese der beiden (α,ß)-stellungsisomeren (na, enantio)-Actinomycine C_1 (2,3)

Die Synthese eines Actinomycins kann prinzipiell auf mehreren gut erprobten Wegen [28] erfolgen (vgl. Schema 1), wie beispielsweise:

A. Synthese eines mit einer Chromophor-Vorstufe acylierten Pentapeptids (4a), dessen oxidative Kondensation zur Actinomycinsäure (6a) und doppelseitiger Lactonringschluß zum iso-Actinomycin 10.

B. Aufbau des bereits lactonisierten, mit dem 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl-Rest geschützten Pentapeptids (5a) und dessen direkte Kondensation zum iso-Actinomycin 9. Zum Pentapeptidlacton 5 führen dabei wiederum zwei unterschiedliche Wege: 1. die direkte Lactonisierung (◀) des linearen 4b, 2. ein Amidringschluß bei bereits vorhandener Lactonbindung, etwa zwischen Aminosäure 4' und 5' (▷).

Die Wege A und B liefern nur iso-Actinomycine (10,9) bzw. bei im Peptidteil unterschiedlichen Kondensationspartnern zusätzlich zwei untrennbare, stellungsisomere aniso-Actinomycine wie 11/12. Die in meinem Fall angestrebte Synthese der getrennten (na,enantio)-Actinomycine 2,3 (=12,11) mußte auf einem anhand der Actinomycin C_2-Synthese ausgearbeiteten [29] modifizierten Wege (aniso-Actinomycin-Weg C) erfolgen.



[1']-[5'] = L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-N-MeVal

[1']-[5'] = D-Thr-L-Val-D-Pro-Sar-D-N-MeVal

= Actinocinyl (vgl. 1a)

Nach Weg C wird ein lineares (4a) mit einem cyclischen (5a) Pentapeptid-Derivat mischkondensiert, wobei man z.B. den cyclischen Partner an C-6 des Acylrestes mit Deuterium (D) markiert [15]. Es entstehen vier Produkte: 1. die Actinomycinsäure 6a - die zum iso-Actinomycin 10 führt, 2, das direkt anfallende 8-Deutero-iso-actinomycin 9 und 3. die beiden gewünschten (α,ß)-stellungsisomeren Actinomycinsäure-lactone 7a,8a. 7a,8a sind - und das ist entscheidend - in der Regel noch chromatographisch trennbar, wobei sich die Isomeren NMR-spektrometrisch anhand des vorhandenen oder fehlenden Deuteriums an C-8 des Chromophors einwandfrei zuordnen lassen. Deuterium tritt nur in den Produkten auf, die den hier cyclischen Peptidrest (dick ausgezogen) in α-Stellung tragen. Die Monolactone können dann getrennt durch erneute Lactonisierung in die beiden gesuchten Isomeren aniso-Actinomycine 11 und 12 überführt werden.

Wie Vorarbeiten im Rahmen meiner Diplomarbeit [31] gezeigt hatten, versagt dieser Actinomycinsäure-lacton-Weg, wenn die beiden Peptidketten zueinander enantiomere Aminosäuren enthalten: 7a und 8a sind chromatographisch nicht mehr trennbar. Die nächstliegende Idee war nun, die Trennbarkeit durch Maskierung der zu stark polaren Carboxygruppe der linearen Peptidkette zu verbessern, d.h. 7a,8a als Ester einzusetzen. Für die spätere Spaltung dieser Actinomycinsäurelacton-ester (7b,8b) kamen weder alkalische (Lactonöffnung am Nachbarpeptid!) noch stärker saure

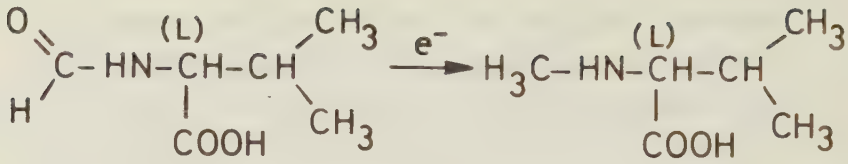
Bedingungen (Austausch der 2-Aminogruppe des Chromophors gegen Hydroxyl!) in Frage. Die mit schwachen Säuren spaltbaren t-Butylester schienen am besten geeignet, brachten aber - wie unten gezeigt wird - synthetische Probleme mit sich. Erstes Syntheseziel für die Darstellung der (na,enantio)-Actinomycine 11,12 (=3,2) war somit der Aufbau des linearen, mit 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl geschützten Pentapeptid-tert.-butylesters 4c - bzw. des noch nicht oxidationsempfindlichen 4d - und des bereits früher benutzten markierten Pentapeptidlacton-derivates 5a [31].

II. 1. Aufbau von N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester (4d)

Die Synthese von solchen mit einer Vorstufe des Actinocinrestes geschützten Pentapeptidestern erfolgt nach bewährtem Muster [9,15] am besten so, daß man zunächst die Aminosäuren 2'-5' zum Tetrapeptidester verknüpft und diesen dann mit der acylierten Aminosäure 1' kuppelt (vgl. die Formeln auf S. 23).

1.1. Darstellung von N-Methyl-L-valin-tert.-butylester

Ausgangsprodukt hierfür ist N-Methyl-L-valin (14) [32], das etwas umständlich über drei Reaktionsstufen aus L-Valin zugänglich ist [32]. Ich versuchte zunächst eine einfacher erscheinende Darstellung, nämlich die elektrolytische



13 14

Reduktion des ohnehin als Ausgangsverbindung (Schema 2) benutzten N-Formyl-L-valins (13). Die Reaktion am Potentiostaten (Platinelektrode) verlief leider trotz vieler Versuche nicht wie erhofft. Bei Formyl-L-valin in 1proz. Schwefelsäure ließ die A/mV-Kurve keine Zersetzungsspannung erkennen; bei 1 Volt angelegter Spannung zeigte sich lediglich die Entwicklung eines Gases, wahrscheinlich Wasserstoff. Nach der Aufarbeitung ließ sich NMR-spektrometrisch kein N-Methyl-L-valin nachweisen. Weitere Versuche in dieser Richtung mit Acetonitril als Lösungsmittel, Platinelektrode und Tetrabutylammoniumbromid als Leitsalz führten bei einer Zersetzungsspannung von 800 mV zur elektrolytischen Entformylierung. Nachweis hierfür war ein Papierrundchromatogramm mit dem Lösungsmittelsystem (LS) Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1): das entstandene ninhydrin-positive Produkt hatte den gleichen R_F-Wert wie die mitlaufende Vergleichssubstanz L-Valin. Nach dem Mißlingen der elektrolytischen Darstellung mußte N-Methyl-L-valin nach bewährter Methode über die Benzylaminosäure und deren Umsetzung mit Ameisensäure und Formaldehyd nach Leuckart-Wallach hergestellt werden [33].

Die Veresterung des N-Methyl-L-valins macht in der Regel - sicherlich aus sterischen Gründen - große Schwierigkeiten. So erhält man den Benzylester nach unterschiedlichsten Methoden selten mit mehr als etwa 35% Ausbeute. Die für den tert.-Butylester erwarteten Schwierigkeiten bestätigten sich, als die - sonst übliche - Umsetzung des Methylvalins im Bombenrohr mit Isobuten und katalytischen Mengen von Schwefelsäure [34,35] gänzlich mißlang. Auch durch Umsetzen mit tert.-Butylacetat und Perchlorsäure [36] ergaben sich keine zufriedenstellenden Ausbeuten. Veresterungsversuche mit tert.-Butanol und Thionylchlorid schlugen ebenfalls fehl und führten wie die Reaktionen mit Isobuten zu öligen, braunen Flüssigkeiten. Die Ausbeutekontrollen erfolgten auf sehr einfache Weise ^{1}H-NMR-spektrometrisch (vgl. unten die typischen δ-Werte).

Erst nachdem ich das N-Methyl-L-valin am N-terminalen Ende durch eine Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Z) geschützt hatte [37], gelang die Darstellung von Z-N-Methyl-L-valin-tert.-butylester (20) nach den obigen Methoden. Die Ausbeuten mit tert.-Butylacetat/Perchlorsäure und Isobuten/Schwefelsäure waren 95 bzw. 70%, wobei das erstere Verfahren schon aus technischen Gründen dem mit Isobuten vorzuziehen ist. Die anschließende Hydrierung der nach beiden Methoden erhaltenen Benzyloxycarbonyl-Verbindungen mit Palladium/A-Kohle in Methanol ergab den gesuchten N-Methyl-L-valin-tert.-butylester (26) mit übereinstimmenden Drehwerten von $[\alpha]_D^{20}$: +19.4 ± 1° (c= 1.1 in Methanol).

Verbrennungsanalysen und ein einwandfreies ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigten die richtige Struktur [δ-Werte: (100 MHz, $CDCl_3$) γ-CH_3 d 0.93 (6H), t-But s 1.46 (9H), 3-H m 1.76-2.02 (1H), N-CH_3 s 1.33 (3H), 2-H d 2.73 (1H)].

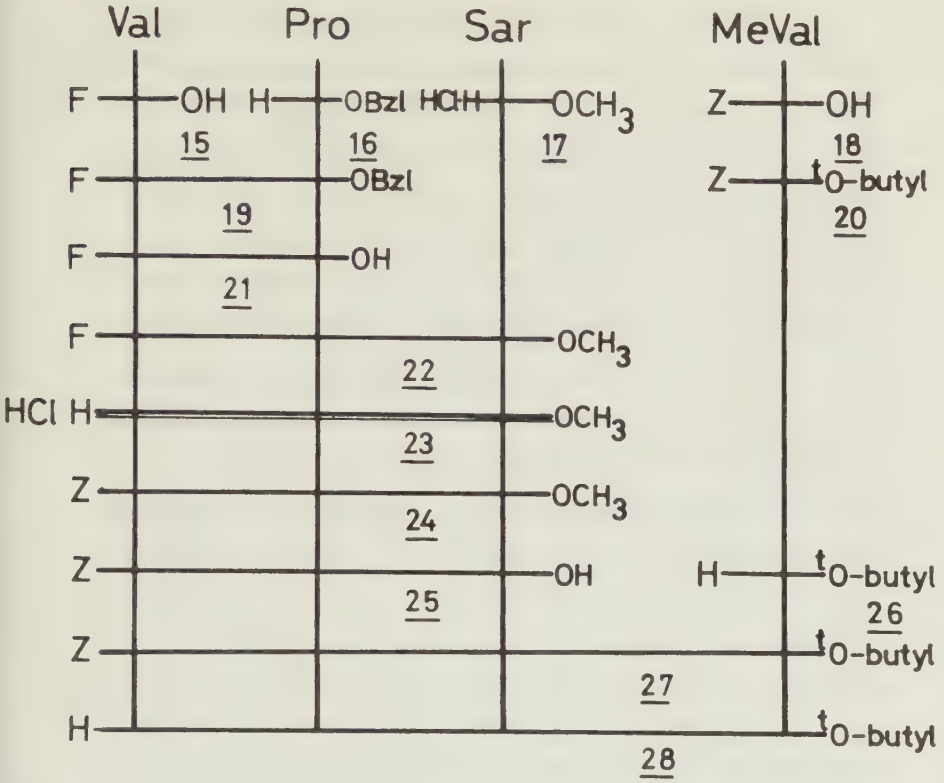
1.2. Aufbau des Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosins(25)

Das Tripeptid 25 als Kupplungspartner für den N-Methyl-L-valin-tert.-butylester (26, Schema 2) wurde auf zwei Wegen synthetisiert: a) über den Tripeptidmethylester 23 (Schema 2) und b) über den Benzylester 30. Ausgangssubstanz war in beiden Fällen Formyl-D-valin (15). Dessen anschließende Kupplung mit L-Prolin-benzylester (16) erfolgte mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Triäthylamin in Methylenchlorid bei 0°. Sie führte zum bereits bekannten Formyl-D-valyl-L-prolin-benzylester (19). In dem folgenden Reaktionsverlauf unterscheiden sich die Wege a und b voneinander.

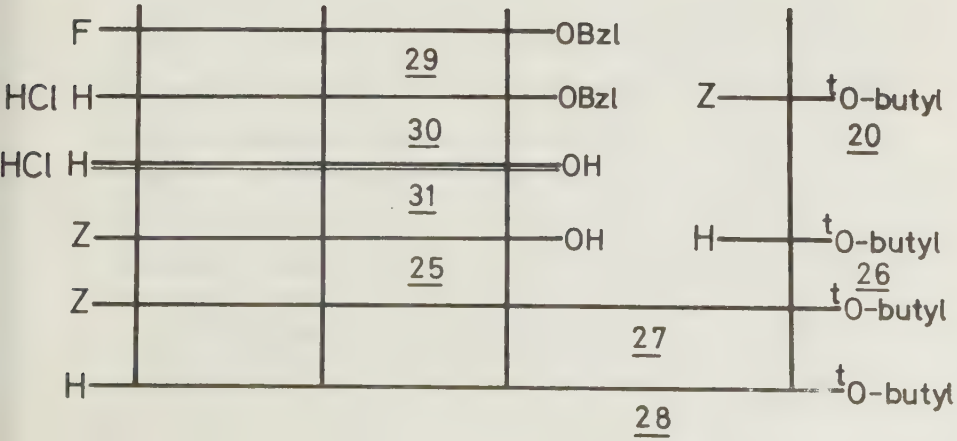
a) Hydrierung des Formyl-Dipeptidesters 19 mit Palladium/A-Kohle in Methanol ergab das Formyl-D-valyl-L-prolin (21), das ähnlich wie sein Enantiomeres [31] aus Äthylacetat/Petroläther nur schwer kristallisiert. Kupplungspartner für 21 war Sarkosin-methylester-hydrochlorid (17), der durch Veresterung des Sarkosins mit Thionylchlorid und Methanol in quantitativer Ausbeute kristallin anfällt [38]. Die übliche Veresterung mit Methanol/Salzsäure ergab zu 91% das hygroskopische 17. Die Kupplungsreaktion von 17 mit 21

Schema 2: Synthese des D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylesters (28)

Weg a



Weg b



wurde wiederum mit Dicyclohexylcarbodiimid und Triäthylamin durchgeführt und das Reaktionsprodukt an saurem Kieselgel (Benzol,Äthylacetat) gereinigt. Der erhaltene Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin-methylester (22) war ein farbloses, nicht kristallisierendes Öl. Die Formyl-Gruppe wurde nun durch eine nicht säurelabile Schutzgruppe ersetzt; denn die spätere Verlängerung des Tripeptids zum Tetrapeptid 27 bringt mit der tert.-Butylgruppe am N-Methyl-L-valin sonst noch eine zweite säurelabile Schutzgruppe in das Molekül. Eine selektive Abspaltung der N-terminalen bzw. der Carboxyl-Schutzgruppe wäre dann nicht möglich. Ich entschied mich daher für einen Austausch der Formyl- gegen eine Benzyloxycarbonyl-Gruppe. Die Entformylierung von 22 erfolgte wie üblich mit 1.5 n methanol. Salzsäure und führte nach einer Dreistufenverteilung zwischen Äthylacetat und Wasser zum Hydrochlorid 23. Das über Kaliumhydroxyd getrocknete 23 wurde in gesättigter $NaHCO_3$-alkalischer Lösung und Tetrahydrofuran als Lösungsvermittler mit Benzyloxycarbonylchlorid/Toluol (1:1) unter 5stdg. Rühren bei 0° zum öligen Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin-methylester (24) umgesetzt. Die Verseifung des Esters 24 gelang nach Katsoyannis [39] in Dioxan/Aceton (1:1) mit 1 n NaOH *). Aus der 45 Min. bei Raumtemperatur gerührten Reaktionslösung wurde unverseifter Ester mit Chloroform extrahiert. Durch Ansäuern mit konz. Salz-

*) Die Gefahr einer Umsetzung zum cyclischen Urethan oder Hydantoin [40] war bei dieser Verseifung nicht gegeben, da das Fehlen einer entsprechenden Hydroxygruppe oder sekundären Amidgruppe in 24 eine Ringschlußreaktion verhindert.

säure bis pH 1-2 wurde Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin (25) als Öl abgeschieden und dann mit Äther extrahiert. Beim Eindampfen des Extraktes bildete sich 25 als weißer Schaum in 69proz. Ausbeute.

b) Hier setzte ich in einer Dicyclohexylcarbodiimid-Kupplungsreaktion das oben beschriebene Formyl-Dipeptid 21 mit Sarkosin-benzylester-hydrochlorid zum doppelt geschützten Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (29) um. Das Rohprodukt wurde wie üblich an saurem Kieselgel (Benzol/Chloroform,Äthylacetat) gereinigt. Das harzartige 29 wurde aus den bei Weg a) angestellten Überlegungen heraus entformyliert. Um eine Umesterung (29 ⟶ 22) zu vermeiden, erfolgte die Abspaltung mit 1.1 n benzylalkoholischer Salzsäure bei 37°. Analoge Versuche mit Dioxan/n Salzsäure (1:1) führten nach 48 Stdn. bei 20° nur teilweise zum entformylierten 30. Die Hydrierung von 29 zu Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin mit Palladium/A-Kohle und die anschließende Entformylierung mit 1.5 n methanol. Salzsäure führte zum unerwünschten rückveresterten Tripeptid 22.

Die Hydrierung des Tripeptidester-hydrochlorids 30 in Methanol/Wasser (20:1) mit Palladium/A-Kohle gab schließlich quantitativ das sehr hygroskopische D-Valyl-L-prolyl-sarkosin-hydrochlorid (31), das als weißer Schaum über frischem Kaliumhydroxyd getrocknet wurde. Das saure 31 wurde zur Kontrolle mit 0.2 n NaOH potentiometrisch in Methanol/Wasser (1:1) titriert. Das gefundene Äquivalent-

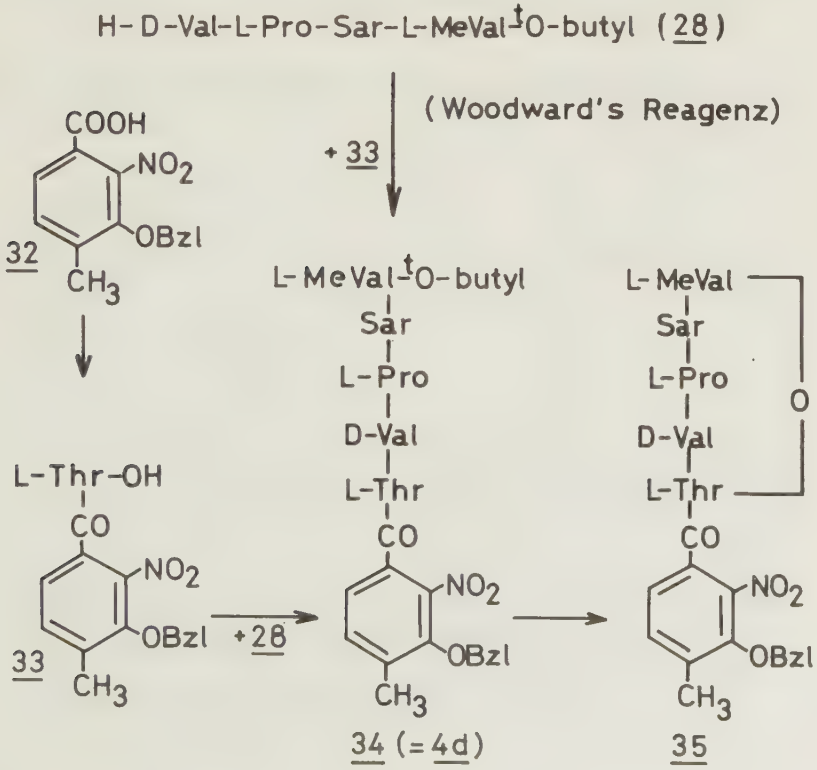
gewicht (325; ber. 321.9) und die Analysendaten entsprachen den berechneten Werten. Die Einführung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe in das freie Tripeptid 31 erfolgte ebenso wie bei der Darstellung von 24 in gesättigter $NaHCO_3$-Lösung/Tetrahydrofuran mit Chlorameisensäure-benzylester unter Rühren (Vibromischer) und Kühlen auf 0°. Wie viele dieser längeren Peptide erhielt ich auch das Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin (25) als weißen Schaum mit $[\alpha]_D^{21}$: -25.0 ± 1° (c= 0.73 in Methanol).

1.3. Verlängerung des Z-Tripeptids 25 zum N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptidester 34

25 wurde zunächst nach bewährter Carbodiimid-Kupplungsmethode in Methylenchlorid bei 0° mit dem schon synthetisierten N-Methyl-L-valin-tert.-butylester (26) zum Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester (27) umgesetzt. Da dieser nicht kristallisierte, wurde er zwecks Abtrennung von Nebenprodukten aus Benzol über eine kurze Aluminiumoxid-(II-III)-säule filtriert. Das von Nebenprodukten freie Äthylacetat-Eluat lieferte 27 in Form eines außerordentlich zähen Harzes in einer Ausbeute von 71%. Die charakteristischen Daten der Substanz stimmten mit denen eines von Marsh und Goodman [40] auf anderem Wege synthetisierten 27 überein. Die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe erfolgte mit 96proz. Ausbeute und lieferte 28 beim Eindampfen

im Vakuum als weißen Schaum. Dieser über KOH getrocknete Tetrapeptidester 28 war Kupplungspartner für das bereits bekannte N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin (33). Dessen Darstellung erfolgte wie üblich aus der 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure (32), die über das Säurechlorid mit L-Threonin gekuppelt wird.

Die Verknüpfung von 28 und 33 erfolgte mit Woodward's Reagenz [41] und der für 33 berechneten Menge an Triäthylamin; denn 28 lag bereits als freie Base vor. Die Reaktion gelang erst nach einigen Schwierigkeiten. Sie muß aus ste-



rischen Gründen behindert sein; denn die Ausbeuten liegen mit 38% noch um 20% niedriger als bei anderen Pentapeptidestern. Die chromatographische Reinigung des braunen, schaumigen Reaktionsproduktes erfolgte mengenmäßig aufgeteilt an vier kurzen Aluminiumoxid-(IV)-säulen, um den Zersetzungsgrad so gering wie möglich zu halten. Von den Säulen wurde mit Benzol/Chloroform (4:1), Äthylacetat und Methanol eluiert. Während die eingedampfte Methanol-Fraktion sich nicht mehr in Chloroform löste, lieferte die Äthylacetat-Fraktion das Pentapeptidderivat 34 als blaßgelbes amorphes Pulver ($[\alpha]_D^{20}$: -42.6 ± 2°, c= 1.0 Methanol).

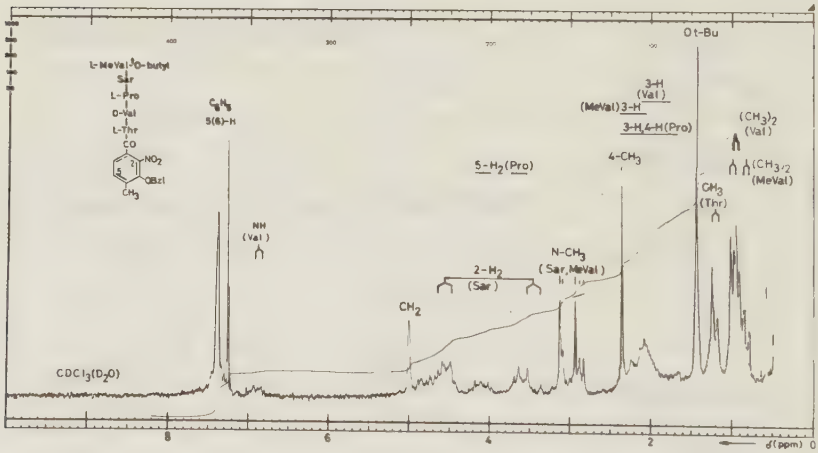


Abbildung 6: 100 MHz-NMR-Spektrum von N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester (34) in Deuterochloroform/D_2O.

Als ausgezeichnete Reinheitskontrolle für 34 diente das NMR-Spektrum (Abb. 6), das bei δ = 2.94 und 3.12 ppm charakteristische N-CH_3-(Sar,MeVal)-Signale und bei δ = 1.45 ppm das Signal der tert.-Butylgruppe aufweist, im übrigen aber mit dem entsprechenden früher synthetisierten Methylester [9] übereinstimmt.

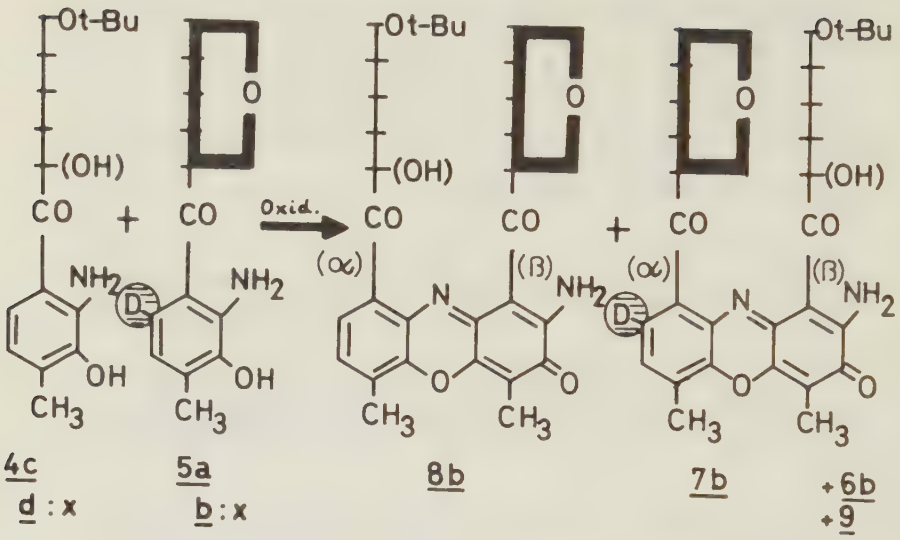
II. 2. (α_{na},ß-enantio)- und ($ß_{na}$,α-enantio)-Actinomycin C_1

2.1. Oxidative Mischkondensation von 4c und 5a zu den Actinomycinsäure-monolacton-tert.-butylestern 7b,8b

Um ganz sicher zu gehen, daß das synthetisierte Pentapeptidderivat 34 (=4d) völlig einheitlich war, chromatographierte ich die gesamte Substanz (1.2 g) dünnschichtchromatographisch an 12 Kieselgelplatten mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol (40:1). Infolge der sauren Eigenschaften des chromatographischen Trägermaterials wurde dabei die tert.-Butylgruppe leider teilweise abgespalten und die Ausbeute an Reinsubstanz auf 787 mg vermindert.

Die Vorstufe des zweiten Kondensationspartners, das N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-cyclo-[D-threonyl-L-valyl-D-prolyl-sarkosyl-N-methyl-D-valyl-O_{Thr}] (5b), war auf bekanntem Wege [31] nach umfangreichen Reinigungsoperationen als weißes, bei 160-165° schmelzendes Pulver mit $[\alpha]_D^{22}$: +13.3 ± 1° (c= 0.6 in Methanol) erhalten worden (Cyclisierungsausbeute 24%).

Aminosäuresequenzen: vgl. Schema 1



X: NO_2 statt NH_2
OBzl statt 3-OH

(na, enantio)-Actinomycinsäure-monolacton-tert.-butylester

Die aus den beiden Pentapeptidderivaten 4d und 5b durch gemeinsame Hydrierung entstehenden N-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptide 4c und 5a sollten bei der Mischkondensation vier verschiedene Reaktionsprodukte geben (vgl. Schema 1, S. 13): 8-Deutero-enantio-actinomycin C_1 (9) [31], Actinomycin C_1-säure-di-tert.-butylester (6b) sowie 8-Deutero-($ß_{na}$,α-enantio)-actinomycin C_1-säure-(α)-lacton-(ß)-tert.-butylester (7b) und (α_{na},ß-enantio)-Actinomycin C_1-säure-(ß)-lacton-(α)-tert.-butylester (8b).

Bei der Kondensation von 4c und 5a im Molverhältnis 1:3 konnte man - gleiche Bildungswahrscheinlichkeiten der vier Produkte vorausgesetzt - mit einem 9,8b,7b,6b-Verhältnis von 1:3:3:9 rechnen. Demzufolge wurden 0.32 mMol 5b und 0.95 mMol 4d in 100 ccm Methanol katalytisch mit Palladium/A-Kohle hydriert und das entstandene 4c,5a-Gemisch in Methanol/0.07 m Phosphatpuffer pH 7.2 (1:1) mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert. Die Lösung nahm bei Zugabe des Oxidationsmittels sofort eine trübe Rotfärbung an, wurde aber nach 19stdg. Rühren bei 20° klar. Das mit Chloroform/Butanol (3:1) extrahierte Substanzgemisch chromatographierte ich dann an einer 4 x 113 cm-Zellulosesäule (LS I: Butanol/Dibutyläther/10proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat, 2:3:5). Nach einer Laufzeit von 9 Tagen hatte sich das Substanzgemisch in fünf breite, intensiv gefärbte Zonen aufgetrennt; am Säulenkopf hinterblieben vier kleine schmale Zonen, die ich wegen vermutlich geringer Substanzinhalte nicht weiter aufarbeitete.

Die Zonen 1 und 2 (Bezifferung in Richtung abnehmender R_F-Werte) wanderten vollständig durch die Säule; sie wurden als getrennte Fraktionen aufgefangen und aufgearbeitet. Die Zoneninhaltsstoffe von 3, 4 und 5 wurden mit Methanol/Wasser (1:1) vom Trägermaterial der zerschnittenen Zellulosesäule abgelöst und dann wie üblich aufgearbeitet. Dabei fiel auf, daß die nicht gut voneinander getrennten Zonen 4 und 5 eine etwas unterschiedliche Färbung besaßen. Zone 4 zeigte ein tieferes Rot als Zone 5. Bei der Reinheits-

kontrolle dieser beiden Zoneninhaltsstoffe im Papierrundchromatogramm mit LS I zeigten sich in Fraktion 4 Beimengungen der Fraktion 5. Daraufhin chromatographierte ich das wie unten ausgefällte Produkt aus Zone 4 nochmals an einer 3.5 x 75 cm-Zellulosesäule (LS I, Laufzeit 3 Tage) und erhielt auf diese Weise noch eine saubere Abtrennung von 18 mg der Fraktion 5 mit $[\alpha]_D^{20}$: +71 ± 6° (c= 0.26 in Methanol).

Versuchsweise wurde eine kleine Probe 4c auch elektrolytisch oxidativ kondensiert. Dies Verfahren schien zunächst den allgemeinen Vorteil zu bieten, daß man die Reaktion ohne zusätzliche, die Lösung verunreinigende Reagenzien durchführen kann und man das Reaktionsprodukt in reinerer Form erhält. Allerdings sind nur wenige organische Verbindungen für sich allein elektrolysierbar, sie müssen hierzu in Wasser oder Methylalkohol löslich und genügend dissoziiert sein. Die meisten Verbindungen leiten den Strom nicht ausreichend, so daß man einen anorganischen Elektrolyten zusetzt. In meinem Versuch gelang zwar eine langsam verlaufende elektrolytische Oxidation an einer Platinelektrode in Methanol mit Tetrabutylammoniumbromid als Leitsalz, war aber wegen des hohen apparativen Aufwandes nicht gewinnbringend. Weitergehende Versuche wären nötig, die Ausbeuten solcher elektrolytischen Kondensationen zu verbessern.

2.2. Identifizierung der aus den Zellulosesäulezonen 1 - 5 isolierten Substanzen

Den durch die Zellulosesäule gewanderten Eluaten der Zonen 1 und 2 wurde durch Schütteln mit gesätt. $NaHCO_3$-Lösg. zunächst das dem Lösungsmittelsystem zugesetzte Kresotinat entzogen. Nach Aufarbeitung, wie im experimentellen Teil beschrieben, erhielt ich aus Zone 1 eine orangefarbene Substanz, die im Papierrundchromatogramm (LS X) zerlief und keine einheitliche Zone bildete. Extinktionsmessungen bei 444 nm ergaben ε-Werte von 13530, wenn man das Molekulargewicht von 6b (MG 1404) zugrunde legte. Üblicherweise liegen die Molextinktionen von Actinocinylverbindungen um ε= 25000-28000. Das NMR-Spektrum in $CDCl_3$/ D_2O zeigte zwei tert.-Butylgruppen bei δ= 1.42 und 1.24 ppm. Zwei spätere Umsetzungsversuche bestätigten die im Papierchromatogramm (LS I) beobachtete Uneinheitlichkeit der Fraktion 1. Wahrscheinlich handelt es sich hier um schnellaufende, mit farblosen Verunreinigungen vermischte Nebenprodukte der oxidativen Kondensation.

Der Inhaltsstoff der Zone 2 mit $[\alpha]_D^{20}$: -86.2 ± 3° (c= 0.41 in Methanol) und einem einheitlichen R_F-Wert (vgl. Tab. 1) ging durch nachfolgende Abspaltung der beiden tert.-Butylgruppen mit Trifluoressigsäure in Actinomycinsäure C_1 (6a) über. Deren Cyclisierung zu Actinomycin C_1 (10) bestätigte, daß der zunächst in Zone 1 vermutete Actinomycin C_1-säure-di-tert.-butylester (6b) in Zone 2 enthalten

Tab. 1 4c/5a- Kondensationsprodukte nach chromatographischer Trennung an der Zellulosesäule

Substanz (Zone)	Schmp. (Zers.)	$[\alpha]_D^{20}$, (c) in Methanol	R-Werte[a]	$\varepsilon_{max}(\lambda_{max})$ in Methanol	Ausbeute [mg]
(1)	124-130°	-66.1±2° (0.20)	—	13530 (444.5)[b] 13160 (424.8)	180
6b (2)	137-140°	-86.2±3° (0.41)	2.32	19970 (444.0) 19305 (424.5)	180
8b (3)	139-147°	-57.6±6° (0.44)	1.52	23235 (444.0) 22430 (424.5) 47200 (236.5)	40
9 + 8b (4)	197-203°	+193.5±5° (0.32)	1.12	19585 (445.0)[c] 34205 (234.4)	53
7b (5)	184-185°	+71.0±6° (0.26)	1.05	23300 (443.0) 22440 (423.0) 41770 (237.0)	105

a) Bezogen auf Actinomycin C_1 = 1.0 (LS X).
b) Bezogen auf Molekulargewicht von 6b.
c) Bezogen auf Molekulargewicht von 9.

war. Dies wurde dann auch durch Vergleich von Fraktion 2 mit einem Kondensationsprodukt, das aus reinem 4c entstand, sichergestellt. Das NMR-Spektrum von 6b zeigte für die beiden tert.-Butylgruppen bei δ = 1.45 ppm ein Singulett.

Die Zonen 3, 4 und 5 wurden aus der Zellulosesäule herausgeschnitten. Ihre Methanol/Wasser-Eluate wurden mit

Chloroform/Butanol (4:1) extrahiert und ergaben nach der Aufarbeitung ebenfalls orangefarbene, aus Chloroform/n-Pentan erhaltene Fällungsprodukte. Die naheliegende Vermutung, die Zonen 4 und 5 würden wegen ihrer dicht beieinander liegenden R_F-Werte die beiden gesuchten Actinomycinsäure-monolacton-tert.-butylester 7b,8b beinhalten, erwies sich nach näheren Untersuchungen als nur teilweise richtig. Gegen die Annahme sprach die unterschiedliche Farbtiefe der Zonen auf der Zellulosesäule, was naturgemäß bei solchen Isomeren nicht der Fall sein sollte. Mit Hilfe der Drehwerte, der R_F-Werte und über die UV- (vgl. Tab. 1) sowie die NMR-Daten gelang jedoch die strukturelle Zuordnung der einzelnen Fraktionen.

Die Substanz der Zone 5 wurde vor allem dadurch identifiziert, daß sie durch Abspaltung der tert.-Butylgruppe und nachfolgende Cyclisierung in 8-Deutero-(β_{na},α-enantio)-actinomycin C_1 (11) überging. Sie mußte somit der gesuchte Actinomycinsäure-mono-lacton-tert.-butylester(7b) sein. Außerdem zeigten die Signalintensitäten des NMR-Spektrums von Fraktion 5 ein erwartetes 9:24 -Protonenverhältnis für die tert.-Butylgruppe bei δ = 1.45 ppm im Vergleich zu den 8 CH_3-Resten der Isopropylgruppen von Valin und Methylvalin bei δ = 0.9 ppm (Drehwert u.a. Daten vgl. Tab. 1).

Den gleichen δ-Wert für die tert.-Butylgruppe und das gleiche Protonenverhältnis zeigte das NMR-Spektrum der Substanz aus Zone 3. Ihr negativer Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$:

$-57.6 \pm 6^{\circ}$ (c= 0.44 in Methanol), der praktisch nur im Vorzeichen von dem für 7b (Tab. 1) verschieden war und die fast kongruenten Elektronenspektren (Abb. 7) von 7b und der Substanz aus Zone 3 führten zur Identifizierung des Inhaltsstoffes der Zone 3 als 8b, das gesuchte Stellungsisomere von 7b.

Der Inhaltsstoff von Zone 4 zeigte im NMR-Spektrum typische Signale des Actinomycins C_1. Daneben fand sich aber auch der bei δ = 1.45 ppm liegende Peak einer tert.-Butylgruppe. Bezogen auf das Isopropylgruppenintegral von Valin und Methylvalin ergab sich jedoch ein Protonenverhältnis von nur 6:24. Die Befunde insgesamt wiesen darauf hin, daß Fraktion 4 eine Mischung aus dem zu erwartenden 8-Deutero—enantio—actinomycin C_1 (9) und einem der Actinomycinsäure-mono-lacton-tert.-butylester, wahrscheinlich 8b war. Dies wurde durch den Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$: $+193.5 \pm 5^{\circ}$ (c= 0.32 in Methanol) bestätigt, der stark von dem des 8-Deutero-enantio-actinomycins C_1 (9) [31] ($[\alpha]_D^{20}$: $+315 \pm 10^{\circ}$) abwich. Auch die Aufeinanderprojektion der NMR-Spektren von 8b und 9 gab ein deckungsgleiches Spektrum mit dem des Inhaltsstoffes der Zone 4. Das 8b/9-Gemisch zeigte im Papierrundchromatogramm (LS X und I) erstaunlicherweise keine Auftrennung. Kristallisationsversuche von 9 aus Äthylacetat/Cyclohexan schlugen, wahrscheinlich wegen der hohen Beimengung von nicht kristallisierendem 8b, fehl.

Bei der oben durchgeführten oxidativen Kondensation von 5a und 4c im Molverhältnis 1:3 (insgesamt 1.0 g) konnte

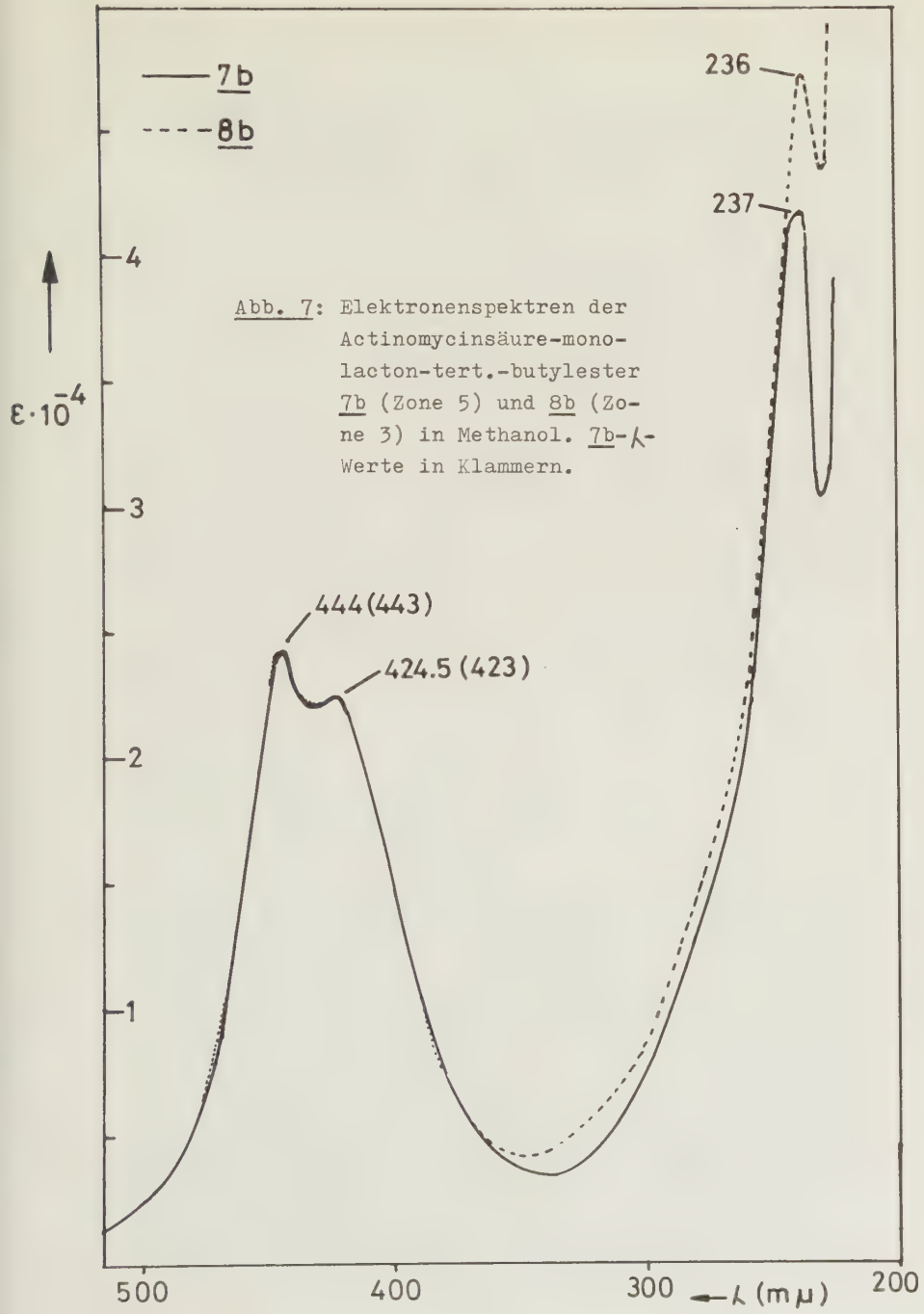


Abb. 7: Elektronenspektren der Actinomycinsäure-monolacton-tert.-butylester 7b (Zone 5) und 8b (Zone 3) in Methanol. 7b-λ-Werte in Klammern.

man, gleiche Bildungswahrscheinlichkeiten der Produkte vorausgesetzt, mit einem 9,8b,7b,6b-Verhältnis von 1:3:3:9 rechnen. Bei Berücksichtigung des als Fraktion 4 isolierten 2:1-Gemisches von 8b und 9 erhielt ich ein Ausbeuteverhältnis von 1:4:6:10.

2.3. Abspaltung der tert.-Butylgruppen

Nach erfolgreicher Trennung der Actinomycinsäure-mono-lactone über ihre tert.-Butylester 7b,8b führte der konzipierte Syntheseweg zunächst zu den einzelnen chromatographisch aber nicht trennbaren Actinomycinsäure-lactonen 7a,8a und - als Nebenprodukt - zur Actinomycin C_1-säure (6a) weiter. Hierzu wurden die Substanzen der Zellulosesäulezonen 2, 3 und 5 (6b,8b,7b) in 100proz. Trifluoressigsäure gelöst und 20 Min. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die drei Substanzen lösten sich mit blutroter Farbe infolge des Halochromie-Effektes, wobei das tertiäre Stickstoffatom des Chromophors protoniert wird. Die Eindampfrückstände wurden jeweils aus Chloroform/Aceton (4:1) an Säulen aus saurem Kieselgel chromatographiert. Die mit Methanol eluierten Substanzen wurden aus Chloroform mit n-Pentan und Petroläther gefällt. Die Identifizierung der roten Reaktionsprodukte erfolgte durch potentiometrische Titration, UV- und NMR-Spektroskopie sowie durch Bestimmung der Schmelzpunkte, R_F-Werte und der optischen Drehung(Tab.2).

Tab. 2 4c/5a-Kondensationsprodukte nach chromatographischer Trennung an der Zellulosesäule und Abspaltung der tert.-Butylgruppen

Substanz	Schmp. (Zers.)	$[\alpha]_D^{20}$, (c) in Methanol	R-Werte[a]	$\varepsilon_{max}(\lambda_{max})$ in Methanol	Ausbeute [mg]
6a (Zone 2)	181-186°	-118±5° (0.21)	0.30	24265 (444.0) 23435 (424.5) 41490 (236.2)	114
7a (Zone 5)	195-203°	+33.0±1° (0.31)	1.17	24960 (444.0) 24145 (424.0) 40150 (237.0)	72
8a + ? (Zone 3)	171-179°	-68.8±2° (0.29)	1.17 0.77	27530 (444.0) 26695 (425.0) 48070 (237.7)	17
7a + 8a[b]	181-198°	-18.4±1° (0.10)	1.17 0.77		
7a + 8a[c]	202-209°	+152±5° (0.26)	1.08		

a) Bezogen auf Actinomycin C_1-säure-(α)-lacton [15] =1.0 (LS VIII).

b) Verunreinigtes 8a aus Zone 3. Mischungsverhältnis 1:1.

c) Messwerte meiner Diplomarbeit [31].

Die Daten der Tabelle 2, Analysenzahlen, die Herkunft der Produkte sowie auch die nachfolgende Cyclisierung des Verseifungsproduktes zu Actinomycin C_1 bestätigten, daß aus dem Di-tert.-butylester 6b (Zone 2) wie zu erwarten

Actinomycin C_1-säure [9] (6a) entstanden war. Die durch Behandeln von 8b (Zone 3) mit Trifluoressigsäure gewonnene Substanz trennte sich im Papierchromatogramm (LS VIII, Tab. 2) wider Erwarten in zwei Komponenten mit den R-Werten von 1.17 und 0.77 (bezogen auf Actinomycin C_1-säure-(α)-lacton [15]) auf. Da auch das Reaktionsprodukt aus 7b (Zone 5), das gesuchte (α)-Lacton 7a, den R-Wert 1.17 zeigte und nach früheren Erfahrungen [31] vom isomeren (ß)-Lacton 8a untrennbar war, mußte die aus 8b entstandene, rascher wandernde Komponente das gewünschte (na, enantio)-Actinomycin C_1-säure-(ß)-lacton (8a) sein. Daß 7a und 8a tatsächlich entstanden waren, ging - abgesehen von der Herkunft der Produkte - auch aus den NMR-Spektren (deren tert.-Butylsignale waren z.B. verschwunden) sowie der späteren Cyclisierung von 7a zum entsprechenden Actinomycin 11 hervor. Eine genauere Auswertung der ^{1}H-NMR-Spektren - z.B. in Bezug auf den Deuteriumgehalt - war bei diesen ziemlich polaren und konformativ uneinheitlichen Actinomycinsäure-lactonen infolge der sehr breitbandigen und multiplen Signale nicht möglich. Auf weitere analytische Untersuchungen und die Identifizierung des 8a-Begleitstoffes mit dem R-Wert 0.77 mußten wegen der kleinen Substanzmengen verzichtet werden.

2.4. Die Lactonisierung des (na,enantio)-Actinomycin C_1-säure-(∝)-lactons (7a) und der Actinomycin C_1-säure

In Analogie zur Cyclisierung von Actinomycinsäuren [9] wurde versucht, 6a (aus Zone 2), 7a (aus Zone 5) sowie die ebenfalls mit Trifluoressigsäure behandelten Substanzen aus den Zonen 1 und 4 mit Acetylchlorid/Acetylimidazol [42] in wasserfreiem Tetrahydrofuran zu lactonisieren. Da durch Konkurrenzreaktionen wie Acetylierung des Threoninhydroxyls, Wasserabspaltung am Threonin, Umwandlung der Carboxyl- in Azolidgruppen, intermolekulare Umsetzungen usw. zahlreiche Nebenprodukte dabei entstanden, mußten die Reaktionsgemische meistens auf mehrfache Weise chromatographiert werden.

7a 11

Als Test für mein Lactonisierungsreagenz [42] wurde zunächst die aus Zone 2 erhaltene Actinomycin C_1-säure (6a) eingesetzt. Das Cyclisierungsprodukt ließ sich wie üblich an Aluminiumoxid (IV) reinigen. Die Äthylacetatfraktion

gab nach Fällen aus Chloroform/n-Pentan und Umkristallisieren aus Äthylacetat/Cyclohexan tatsächlich ein Produkt, das in allen Eigenschaften (Tab. 3) mit Actinomycin C_1 (10) übereinstimmte. Von den versuchsweise cyclisierten, den Zonen 1 und 4 entstammenden Substanzen gab die aus Zone 1 zahlreiche im Papierchromatogramm leidlich trennbare, aber nicht zu identifizierende Komponenten. Die mit schlechter Ausbeute verlaufene Lactonisierung des Stoffes aus Zone 4 - wahrscheinlich u.a. zum aniso-Actinomycin 12 - stärkte den durch Drehwert und NMR-Spektrum erhaltenen Befund, daß das Ausgangsprodukt zumindest teilweise schon cyclisiert als 9 vorlag. Das aus dem (na, enantio)-Actinomycin C_1-säure-(α)-lacton (7a) erhaltene rohe Cyclisierungsprodukt löste sich nicht in Benzol und wurde daher aus Benzol/Chloroform (10:1) an Aluminiumoxid(IV) adsorbiert. Nur die mit Äthylacetat eluierte Fraktion enthielt eine rote Substanz, deren NMR-Spektrum dem eines Actinomycins ähnelte. Sie wurde aus Methanol nochmals an Sephadex LH 20 chromatographiert. Das isolierte Produkt (16 mg) war im 30cm-Papierrundchromatogramm (LS X) einheitlich. Das nicht sehr scharfe ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 8) zeigte erwartungsgemäß eine Ähnlichkeit mit dem des früher synthetisierten (na,enantio)-Actinomycin-Isomerengemisches 11/12 [31] (Abb. 9). In diesem Fall konnte nur eines der beiden Isomeren vorliegen, und zwar nach den im Aromatenbereich erkennbaren Signalen das an C-8 des Chromophors markierte 11. Das Spektrum eines undeuterierten Produktes wie 12 zeigt nämlich

Tab. 3 Das synthetisierte Actinomycin 11 verglichen mit Actinomycin C_1 und einem 11/12-Gemisch

Actinomycin (Zone)	Schmp. (Zers.)	$[\alpha]_D^{20}$, (c) in Methanol	R-Wert[a]	$\varepsilon_{max}(\lambda_{max})$ in Methanol	Bakteriostat. Wirks.[b]
C_1 = 10 (2)	244-245° (Bipyram.)	-312±10° (0.21)	1.0	24300 (443) 32910 (241)	>1:25·10^6
11 (5)	180-181°	-18.5±1° (0.22)	0.66	18130 (443) 17835 (423) 34610 (236)	unwirks.
11 + 12 [c]	233-240° (Nadeln)	-3.7±0.7° (0.27)	0.75	23200 (443) 37450 (237)	unwirks.

[a] Bezogen auf Actinomycin C_1 = 1.0 (30 cm-Papierrundchromatogramm, LS X).

[b] Verdünnungstest gegen Bac. subtilis; bezogen auf Actinomycin C_3 = 1:25·10^6. Für den Test gelöst in Aceton/Wasser (1:4).

[c] Messwerte des chromatographisch nicht zu trennenden 11/12-Gemisches [31].

vier Linien von 7-H,8-H bei δ = 7.36 und 7.62 ppm (J = 8 Hz), die bei deuteriertem C-8 (11) auf ein Singulett für 7-H (δ = 7.38 ppm) - und nur das erkennt man im Spektrum von 11 - zusammenfallen. Der R_F-Wert von 11 wich etwas von dem des 11/12-Gemisches ab; wahrscheinlich aus experimentellen Gründen, da 11/12 für einen direkten Vergleich nicht mehr

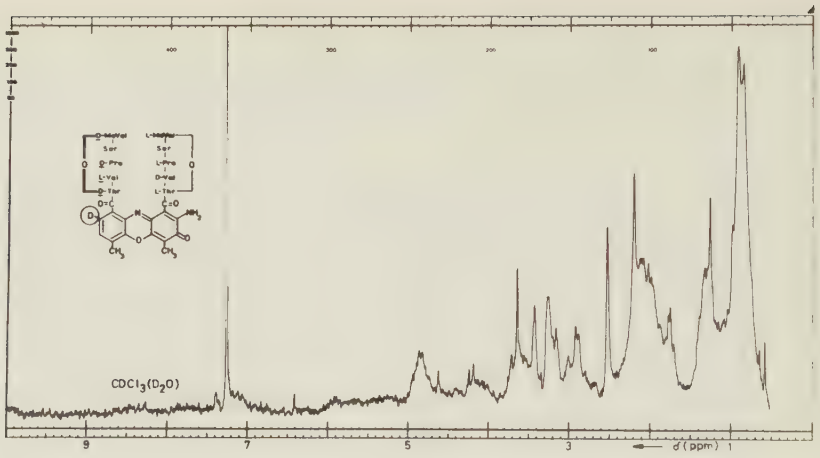


Abbildung 8: 100 MHz-NMR-Spektrum des 8-Deutero-(β_{na},α-enantio)-actinomycins C_1 (11, Zone 5).

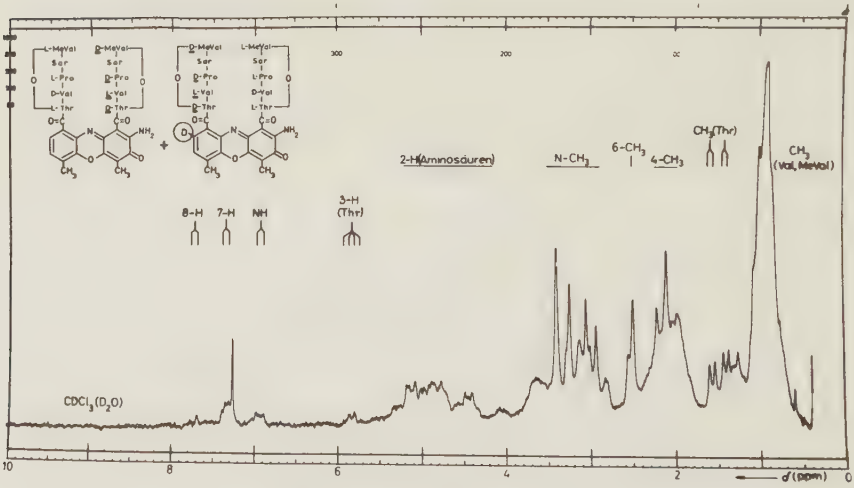


Abbildung 9: 100 MHz-NMR-Spektrum des (α_{na},ß-enantio)-Actinomycin C_1/8-Deutero-(β_{na},α-enantio)-actinomycin C_1-Gemisches (12/11) [31].

verfügbar war. Das infolge der kleinen Menge nicht kristallisierende Produkt zeigte einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$: $-18.5 \pm 1^\circ$ (c= 0.22 in Methanol, vgl. Tab. 3) *) und erwies sich im bakteriostatischen Test gegen Bac. subtilis als völlig unwirksam.

Das auf diesem neu erprobten Syntheseweg über die Actinomycinsäure-mono-lacton-tert.-butylester erhaltene (β_{na},α-enantio)-Actinomycin C_1 (11) zeigt zunächst als wesentliches Ergebnis, daß die getrennte Synthese von derartigen zueinander enantiomeren und (α,β)-stellungsisomeren Actinomycinen wie 11 und 12 möglich ist. Daß die Ausbeuten, vor allem beim Schließen des zweiten Lactonringes, im Vergleich zur Synthese von Actinomycinen mit zwei natürlich konfigurierten Peptidketten (Lactonisierung:55-60%) schlecht sind, beruht hauptsächlich auf folgendem:
a) Die oxidative Mischkondensation der beiden Pentapeptidvorstufen (4c,5a) verläuft - vermutlich aus sterischen Gründen - nicht so glatt wie beim Aufbau nativer Actinomycine; b) die tert.-Butylester sind sehr säureempfindlich und die Folgen der 9-tägigen Trennoperation auf den erforderlichen kresotinsauren Zellulosesäulen sind noch ungeklärt; c) die Trifluoressigsäurebehandlung der tert.-Butylester ist für den Actinocinylrest der Moleküle noch zu rauh; d) die gute Ausbeute bei der Lactonisierung der

*) Der für das 11/12-Gemisch gefundene Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$: $-3.7 \pm 0.7^\circ$ (c= 0.27 in Methanol) muß daher rühren, daß das 12/11-Gemisch im Verhältnis 1:1.3 vorgelegen haben muß.

zweiten Peptidkette von natürlichen Actinomycinsäure-mono-lactonen wird ganz offensichtlich dadurch begünstigt, daß die lineare Kette durch die benachbarte, bereits cyclisierte Kette konformativ vorgeordnet wird; diese Präformierung entfällt zwangsläufig bei konfigurativ veränderter Nachbarkette. Die Ausbeute bei einem Cyclisierungsversuch mit dem erhaltenen (α_{na},ß-enantio)-Isomeren 8a zu 12 war für eine Charakterisierung des Endproduktes zu gering. Für weitergehende Untersuchungen über das Verhalten der beiden (na,enantio)-Actinomycine 11 und 12 müßten aufgrund der hier gewonnenen Erfahrungen größere Substanzmengen synthetisiert werden.

III. Synthesewege zu einem zweifach überbrückten (CC)-Actinomycin (Abb. 10) sowie zu den Actinomycinen $X_{o\beta}$, i-$X_{o\beta}$ und (3'α,β-Hyp)-actinomycin C_1

Der in der Einleitung skizzierte Plan zur Synthese eines zweifach überbrückten, in der CC-Konformation gehaltenen Actinomycins schien am ehesten realisierbar, wenn man als zweiten Verknüpfungspunkt der (α)- und (β)-Peptidketten die Hydroxygruppe von 4-Hydroxy-L-prolin vorsah. Da 4-Hydroxyprolin in einigen nativen Actinomycinen wie $X_{o\beta}$, $X_{o\delta}$ zumindest den 3'-Prolinrest der (β)-Peptidkette ersetzen kann ohne die Raumstruktur des Moleküls wesentlich zu verändern [27], war zu hoffen, daß 1) das Actinomycingerüst auch noch eine zweite Hydroxygruppe im (α)-Peptid ohne gravierende Auswirkungen auf die Raumstruktur und damit die Wirksamkeit tolerieren würde und 2) der einzelne Peptidlactonring seine natürliche Konformation trotz der

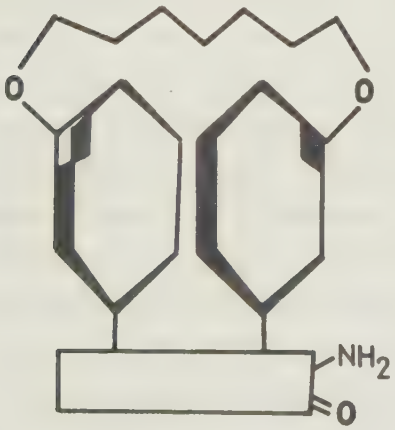
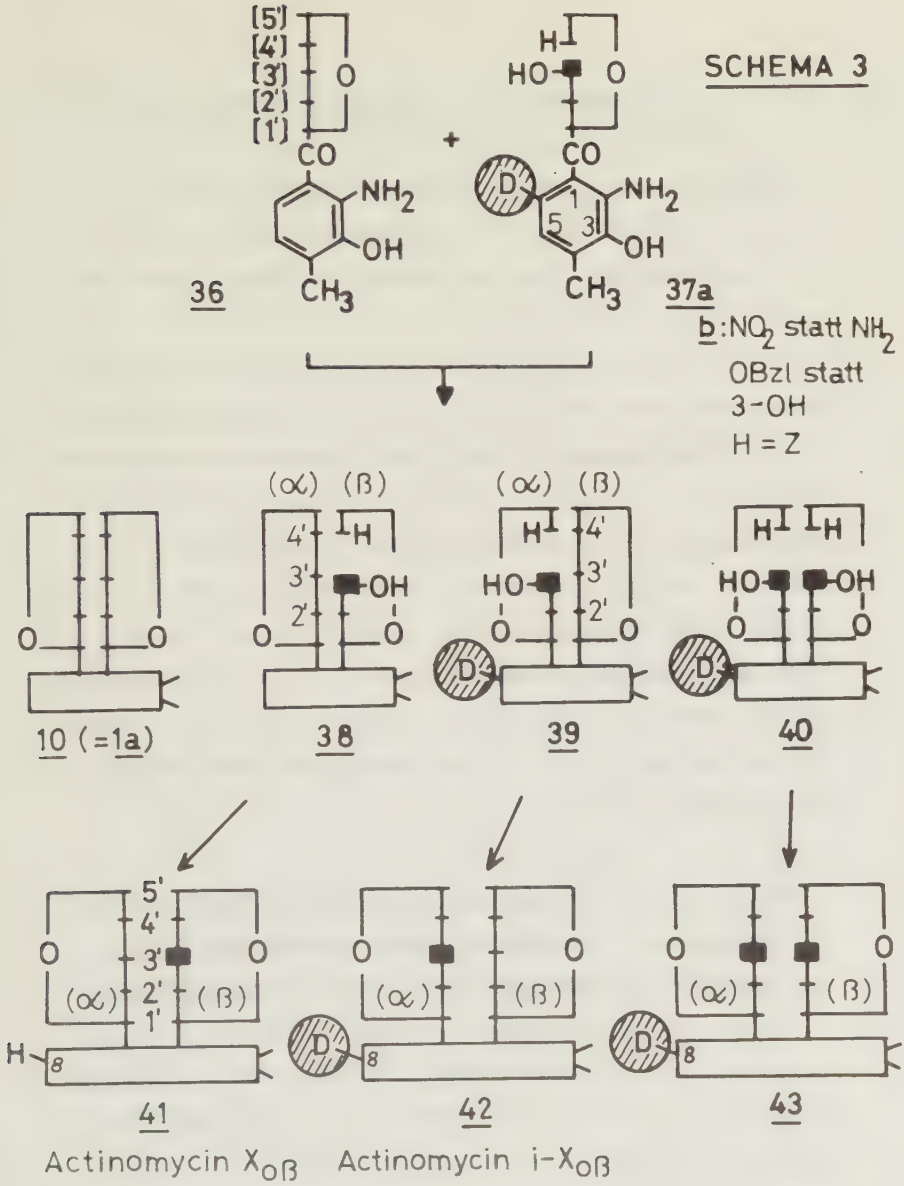


Abb. 10: Schematische Darstellung einer konformationsstabilisierenden Verknüpfung der beiden Peptidringe über die Hydroxylfunktionen von 4-Hydroxyprolin.

Hydroxygruppe weitgehend beibehält und z.B. die Cyclisierungsreaktion - zumindest aus sterischen Gründen - nicht allzu sehr behindert ist. Variationen anderer Aminosäuren des Actinomycins C_1 hatten bereits zu einem völligen Versagen der Lactonisierungsreaktion geführt [9]. Die Einführung von 4-Hydroxyprolin war weiterhin vorteilhaft, da bereits Brockmann und Manegold [27] zeigen konnten, daß sich die Hydroxylgruppe in ($3'_{\beta}$-Hyp)-actinomycinen wie $X_{o\beta}$, $X_{o\alpha}$ ohne weiteres nachträglich mit einer Fettsäure (z.B. zum Palmitat) verestern ließ. Hydroxygruppen in (α) und (β) eines synthetisierten Actinomycins konnten somit vermutlich auch mit einer Dicarbonsäure verestert werden, was dann zu der gewünschten zweiten Peptid/Peptid-Brücke führen würde. Im übrigen ergab die Synthese eines ($3'_{\alpha,\beta}$-Hyp)-actinomycins (43) entsprechend Schema 3 als Nebenprodukte zwei sehr interessante Actinomycine: das natürlich vorkommende $X_{o\beta}$ (41) und dessen unbekanntes Isomere i-$X_{o\beta}$ (42).

Der geplante Syntheseweg (Schema 3) entsprach im Prinzip der in Abschnitt II schon erläuterten oxidativen Mischkondensation von einer cyclischen (36) und einer linearen (37a) Pentapeptidvorstufe (eine davon an C-6 deuteriert) mit nachfolgender getrennter Cyclisierung der offenen Peptidkette zum gewünschten Actinomycin. Die bewährte Lactonisierung der entsprechenden Actinomycinsäure-mono-lactone (Schema 1) mit Acetylchlorid/Acetylimidazol [42] fiel allerdings aus, wenn es nicht gelingen würde, die sekundäre Hydroxygruppe des 4-Hydroxyprolinrestes ziemlich stabil


SCHEMA 3
[5']
[4']
[3']
[2']
[1']
CO
NH2
OH
CH3
HO
D
36
37a
b: NO2 statt NH2
OBzl statt
3-OH
H = Z
(α) (β)
4'
3'
2'
10 (=1a)
38
39
40
5'
1'
8
41
42
43
Actinomycin X0β
Actinomycin i-X0β
[1']-[5'] = L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-N-MeVal
= Actinocinyl
= L-Hyp (=4-Hydroxy-L-prolyl)

und dennoch reversibel (z.B. als Benzyläther) zu maskieren. Die Aussichten dafür waren nach dem Studium der Literatur nicht günstig, da bereits die selektive Benzylierung von Tyrosin [43-45] (am phenol. Hydroxyl) oder Serin [46-49] (primäres Hydroxyl) zum Teil erhebliche Schwierigkeiten macht.

Mehr Erfolg versprach der in Schema 3 skizzierte Weg über Seco- bzw. Bis-seco-actinomycine (38,39 bzw. 40), die zwischen Aminosäure 3' und 4' aufgetrennt sind. In diesem Falle konnte man beide Lactonbindungen vor dem Einführen des Hydroxyprolins knüpfen, so daß als letzter Syntheseschritt das sehr viel milder verlaufende Knüpfen von Säureamidbindungen (38,39,40 ⟶ 41,42,43) blieb, wofür das Hydroxyprolin-hydroxyl unter Umständen nicht geschützt zu werden brauchte. Nächstliegendes Syntheseziel war somit der Aufbau des bereits die Lactonbindung enthaltenden Pentapeptid-Derivates 37b.

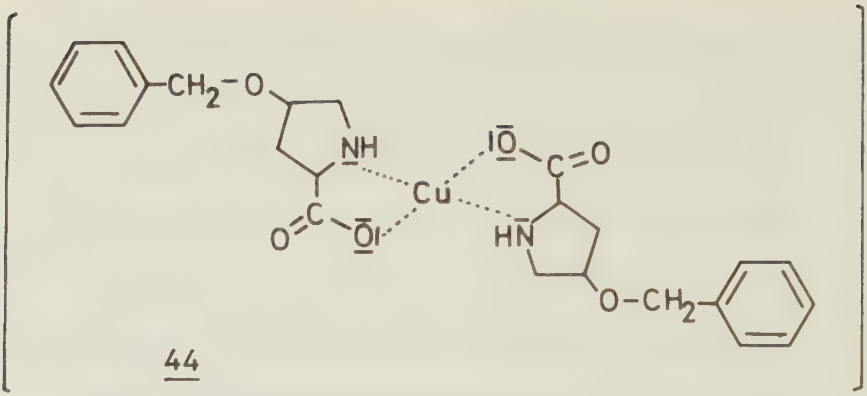
III. 1. Aufbau von N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-O_{Thr}-[benzyloxycarbonyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl]-L-threonyl-D-valyl-4-hydroxy-L-prolin (37b)

Bei dieser Synthese sollte - in Anlehnung an bewährte Verfahren - im Prinzip wiederum zunächst der Peptidteil aufgebaut und dieser dann mit der Vorstufe für den Actinomycinchromophor zu 37b verknüpft werden. Vorweg war abzuklären, ob und wie stabil sich 4-Hydroxyprolin an der Hydroxylgruppe schützen lassen würde.

1.1. Versuche zur Maskierung von 4-Hydroxyprolin

Eine Schutzgruppe, die allen Anforderungen am besten genügte, war der O-Benzylrest. Als auch nicht photosensitive Schutzgruppe ist sie wenig basen- und säurelabil, dabei aber hydrogenolytisch leicht abspaltbar. Wenn es gelänge, die 4-OH-Gruppe des L-Hydroxyprolins in eine Benzyläthergruppe umzuwandeln, hatte die Synthese von 37b auf den erprobten, in Schema 2 skizzierten Wegen Aussicht auf Erfolg.

Wie sich herausstellte, war aber schon die Benzylierung zum 4-Hydroxy-L-prolin-benzylester-hydrochlorid [50] mit Benzylalkohol/Salzsäure stark behindert. Trotz mehrmaliger Wiederholung des Veresterungsschrittes (1.5stdg. Gaseinleiten), bei dem sich wegen vorhandener Aminosäureverunreinigungen die Lösung rot färbte, erreichte ich nur eine Ausbeute von maximal 30% (L-Prolin: 90%). Die Veresterung zum 4-Hydroxy-L-prolin-methylester-hydrochlorid [50] gelang dagegen mit 94proz. Ausbeute. Alle Verätherungsversuche von 4-Hydoxy-L-prolin über Kupfer-, Nickel- und Kobalt-Komplexe [51] schlugen - wahrscheinlich aus sterischen Gründen-fehl. Hierbei wurde 4-Hydroxy-L-prolin beispielsweise in einer äquimolaren Menge 2 n NaOH gelöst und mit $Cu(SO_4)_2 \cdot 5H_2O$, $Ni(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ bzw. $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 15 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Die abgesaugten Niederschläge wurden in Methanol und nochmals der gleichen Menge 2 n NaOH gelöst und 1 Stde. bei 25° mit Benzylbromid



44

geschüttelt. Der erwartete O-Benzyl-L-hydroxyprolin-Metall-Komplex wie 44 entstand, auch nach Variation der Reaktionsbedingungen, nicht. In der Hoffnung, daß sich vielleicht ein C- und N-terminal geschütztes Dipeptid wie Valyl-hydroxyprolin mit Benzylbromid veräthern lassen würde, synthetisierte ich mit Hilfe von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid Formyl-D-valyl-4-hydroxy-L-prolin-benzylester und Formyl-D-valyl-4-hydroxy-L-prolin-methylester. Leider reagierte auch hier die Hydroxylgruppe des Hydroxyprolinrestes nicht mit Benzylbromid. Beim Formyl-dipeptid-methylester fiel im Gegensatz zum entsprechenden Benzylester die gute Wasserlöslichkeit auf.

Da eine Totalsynthese von 4-Benzyloxy-L-prolin nicht in Frage kam *), entschloß ich mich, auf die Benzylschutzgruppe zu verzichten und eine Maskierung des 4-Hydroxyls durch den tert.-Butylrest zu versuchen. Das gelang, wie unter 1.2. näher erläutert, nach zwei Methoden. Für den

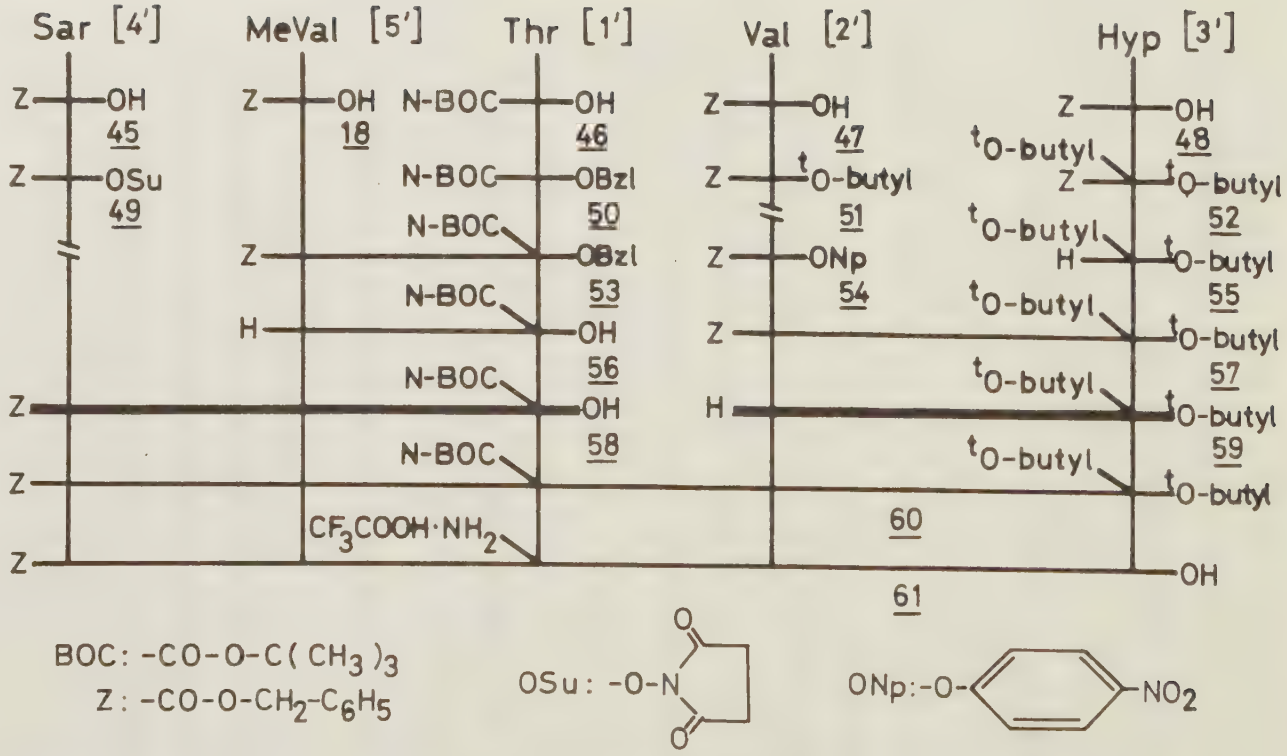
*) Die Synthese von 4-Hydroxy-L-prolin aus D-Glutaminsäure ist kürzlich beschrieben worden [52].

weiteren Syntheseweg nahm man damit allerdings in Kauf, daß diese säurelabile Gruppe sowohl bei der chromatographischen Reinigung der Folgepeptide als auch besonders bei der späteren Lactonisierungsreaktion Schwierigkeiten machen konnte. Die Synthesestrategie wurde daher gegenüber dem ursprünglichen Plan, der die Lactonisierung der Actinomycinsäure-mono-lactone analog Schema 1 vorsah, insofern geändert, als nun beide Lactonbindungen zwischen den Aminosäuren 1' und 5' vor dem Anknüpfen der geschützten Hydroxyprolin-reste [3'] geschlossen werden sollten. Damit ergab sich für das in 37b zu überführende Pentapeptid 61 der in Schema 4 skizzierte Syntheseplan: Verknüpfung der Aminosäuren 2' und 3' zu 59, daneben von 5' und 1' zu 56 und dann Kupplung von 56 mit Aminosäure 4' zu 58. 58 und 59 sollten das zwischen Aminosäure 3' und 4' noch geöffnete Depsi-pentapeptid *) 61 ergeben.

1.2. Synthese von D-Valyl-(O-tert.-butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (59)

Da die Knüpfung der Peptidbindungen bei Synthesen biologisch aktiver Peptide wie der Actinomycine möglichst ohne Racemisierung der Aminosäuren erfolgen muß, waren die gut kontrollierbaren Peptide 58 und 59 ausgezeichnete Teilstücke für eine nachfolgende Fragmentkondensation.

*) Depsipeptide sind alle Peptide, die neben Peptid- auch Esterbindungen enthalten.



Schema 4: Synthese von O-(Benzyloxycarbonyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl)-L-threonyl-D-valyl-4-hydroxy-L-prolin · CF_3COOH (61)

Zur Darstellung des Dipeptids 59 aus den Aminosäuren 2' und 3' boten sich zahlreiche unterschiedliche Kupplungsmethoden an [53]. Da p-Nitrophenylester von N-geschützten Peptiden bei Kupplungen in Methylenchlorid Racemisierungsraten von 0.6% [54] aufwiesen, entschied ich mich für die p-Nitrophenylester-Methode.

Erstes Syntheseprodukt war somit der Benzyloxycarbonyl(Z)-D-valin-p-nitrophenylester (54) [35,44], den ich durch Umsetzen von Z-D-Valin (47) mit p-Nitrophenol und DCC als Dehydratisierungsreagenz in Methylenchlorid erhielt. Zur Vermeidung von photokatalysierten Reaktionen der NO_2-Gruppe mußte die Reaktion unter Lichtabschluß verlaufen. Das Produkt wurde aus Benzol an einer Aluminiumoxid-(I)-säule (W 200 basisch, "Woelm") adsorbiert und mit Benzol, Äthylacetat und Methanol eluiert. Interessanterweise zersetzte sich 54 als aktivierter Ester nicht auf dieser Säule und kristallisierte aus den eingedampften Benzol- und Äthylacetat-Fraktionen.

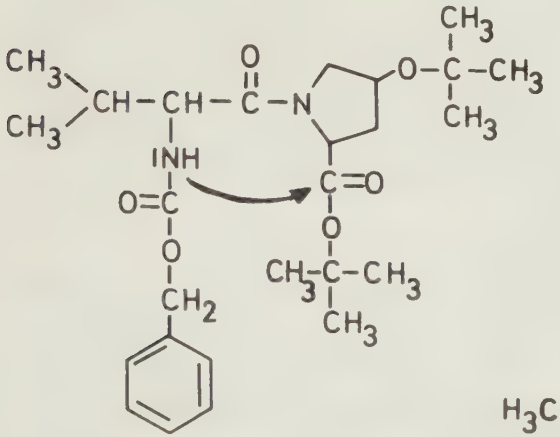
Kupplungspartner für 54 war der (O-tert.-Butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (55). Zu dessen Synthese ging ich vom bekannten N-(Benzyloxycarbonyl)-4-hydroxy-L-prolin (48) aus, das nach zwei Methoden in das Bis-tert.-butyl-Derivat 52 übergeführt wurde. Nach Methode A mit Isobuten/Schwefelsäure im Bombenrohr [34,35] war die Ausbeute 76%. Die weniger aufwendige Methode B nach E. Taschner [55] mit tert.-Butylacetat/Perchlorsäure gab 52 in 98proz. Ausbeute als farbloses Öl. Auch Z-D-Valin (47)

konnte nach B mit ähnlich hohen Ausbeuten verestert werden. Daß bei der Umsetzung von 48 zugleich die 4-Hydoxygruppe des Hydroxyprolins veräthert wurde, zeigten zwei scharfe tert.-Butyl-Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum bei δ = 1.45 und 1.17 ppm an. Wie aus dem Spektrenvergleich mehrerer synthetisierter tert.-Butylester hervorging, war das Signal bei δ = 1.45 eindeutig der Estergruppe und das bei 1.17 ppm der Äthergruppe zuzuordnen (vgl. Abb. 6). Die hydrogenolytische Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe aus 52 gelang dann wie üblich in Methanol mit Pd/A-Kohle als Katalysator.

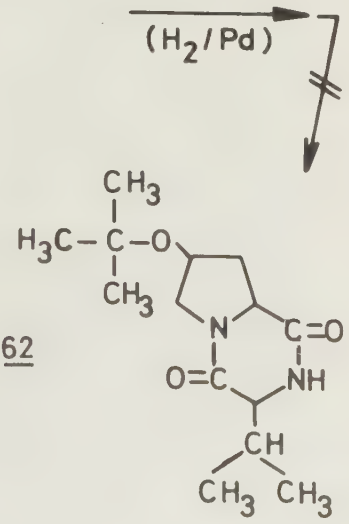
Die Verknüpfung von 54 und 55 zum Z-D-Valyl-(O-tert.-butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (57) erfolgte nach Anderson und Callahan [56] durch dreitägiges Aufbewahren der in Methylenchlorid gelösten Reaktionspartner bei Raumtemperatur. Nach Adsorption des öligen Rohproduktes an Aluminiumoxid(I) [W 200 basisch] lieferten die eingedampften Benzol- und Äthylacetat-Eluate nach Umkristallisation aus Äthylacetat/Cyclohexan (1:1) das bei 125° schmelzende 57 in Form feiner, farbloser Nadeln mit $[\alpha]_D^{20}$: -12.4 ± 0.3° (c= 1.55 in Methanol).

Bei der anschließenden Hydrogenolyse des maskierten Dipeptids 57 zum freien Ester 59 bestand die Möglichkeit für eine Cyclisierung zum Diketopiperazin 62. Gewöhnlich sind die tert.-Butylester von Dipeptiden ziemlich stabil gegenüber dieser Nebenreaktion. Allerdings kommt es dabei wohl auf die Art der Peptide an. Während Anderson und

Callahan [57] bei Glycyl-L-phenylalanin-tert.-butylester selbst nach 23 Tagen bei Raumtemperatur kein Diketopiperazin nachweisen konnten, fanden Marsh und Goodman [40] eine erhöhte Tendenz zur intramolekularen Reaktion bei Dipeptiden, die Prolin enthalten wie z.B. der L-Prolyl-sarkosin-tert.-butylester. Das Dipeptid 59 zeigte keine Neigung zur Diketopiperazinbildung. Sein NMR-Spektrum, das einen Tag nach der Hydrierung von 57 aufgenommen wurde, ließ keinen Intensitätsverlust der tert.-Butylprotonen-Signale gegenüber denen der übrigen Protonen des Moleküls erkennen.



57



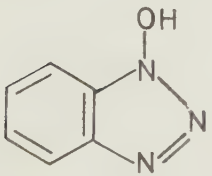
62

1.3. Aufbau des Depsipeptids 58

Das Depsi-tripeptid 58, der Kupplungspartner für das Dipeptid 59, wurde in Anlehnung an Meienhofer [58] dargestellt. Ausgehend vom relativ beständigen, nach mehreren Methoden synthetisierten tert.-Butyloxycarbonyl-azid[59-63] (BOC-Azid) gelangte ich nach Umsetzen mit L-Threonin bei konstantem, stets mit 4n NaOH nachreguliertem pH-Wert von 9.5 in 92proz. Ausbeute zum tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonin (46) [60]. Um Folgeprodukte säulenchromatographisch gut reinigen zu können und evtl. höhere Reaktionsausbeuten zu erzielen, veresterte ich 46 mit Benzylchlorid und Triäthylamin nach einer Methode von Baer und Eckstein[64]. Das Rohprodukt wurde an einer Aluminiumoxid-(II-III)-säule chromatographiert. Überschüssiges Benzylchlorid kam durch Nachwaschen mit wenig Benzol von der Säule. Der gesuchte N-BOC-threonin-benzylester (50) mit $[\alpha]_D^{20}$: -21.8 ± 2° (c= 3.2 in Methanol; Lit. [40]: -19.6°) befand sich im Äthylacetat-Eluat.

Zum Knüpfen der Lactonbindung zwischen den Aminosäuren 1' und 5' gemäß Schema 4 versuchte ich, Benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin (18) [37] mit BOC-L-threonin-benzylester (50) nach verschiedenen Methoden zu 53 umzusetzen, wobei das Herausfinden der optimalen Reinigungsmethode ein Hauptproblem war. Nach langwierigen Versuchen führten nur zwei Verfahren zum Erfolg.

Zunächst versuchte ich die Veresterung von 18 und 50 mit DCC und Pyridin in Aceton. Die säulenchromatographische Reinigung des Reaktionsgemisches an Aluminiumoxid(II-III) verkleinerte die Substanzmenge um 40%, was auf einen beachtlichen Anteil an nicht umgesetztem 18 schließen ließ. Dem entsprach die plattenchromatographische Trennung einer Probe auf Kieselgel (LS III). Auch die NMR-Spektren zeigten nach der Hydrierung des rohen 53 zum vermeintlichen 56 ein komponentenreiches Gemisch an. Daraufhin versuchte ich die Veresterung von 18 u.a. nach König und Geiger [65] mit N-Äthyl-morpholin, 1-Hydroxybenzotriazol (63) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in Methylenchlorid. Der Zusatz von 63 ermöglicht eine racemisierungsfreie Knüpfung von Peptidbindungen und unterdrückt wegen seiner raschen Reaktion mit den aus der Carboxylkomponente und DCC gebildeten Isoharnstoffderivaten die Bildung von Nebenprodukten. Zudem ist der so gebildete Hydroxybenzotriazol-Ester aktiver als ein Isoharnstoffderivat. Im Falle der hier zu knüpfenden Esterbindung wurde ich aber von der erhofften Wirkung des 1-Hydroxybenzotriazols (63) enttäuscht. Die sonst schnelle Reaktion des Threoninhydroxyls mit der aktivierten Carboxylgruppe von 18 ist wahrscheinlich schutzgruppen-



63

behindert. Weitere Veresterungsversuche mit DCC und Triäthylamin in Methylenchlorid waren ebenfalls negativ.

Erst nach der - wegen der Racemisierungsgefahr nicht optimalen - "gemischten Anhydrid-Methode" mit Chlorameisensäure-isobutylester/Triäthylamin gelang bei -7° im Kryomaten die gewünschte Veresterung von 18 und 50 zu leidlich einheitlichem 53. Nach umfangreichen Chromatographieversuchen erfolgte die Reinigung des Rohproduktes entweder an Sephadex LH 20 oder an einer kombinierten Aluminiumoxid- und Kieselgelsäule. Gemessen an der aufwendigen, zuweilen zur Trennung benutzten Gegenstromverteilung war die letztere Säulenkombination einfach und überaus wirkungsvoll. Zum Verfolgen der Reinigungsschritte dienten die NMR-Spektren (Abb. 11-13). Abb. 11 zeigt das

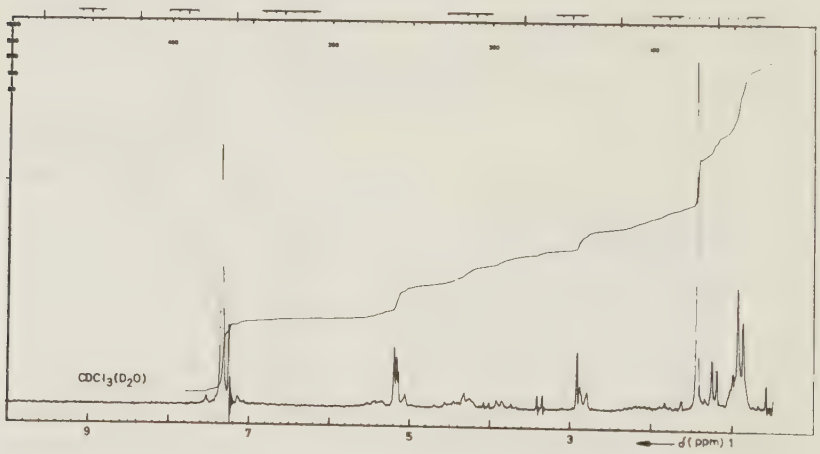


Abbildung 11: 100 MHz-NMR-Spektrum des verunreinigten N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-O-(benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valyl)-L-threoninbenzylesters (53) nach Anhydrid-Kupplung von 18 und 50.

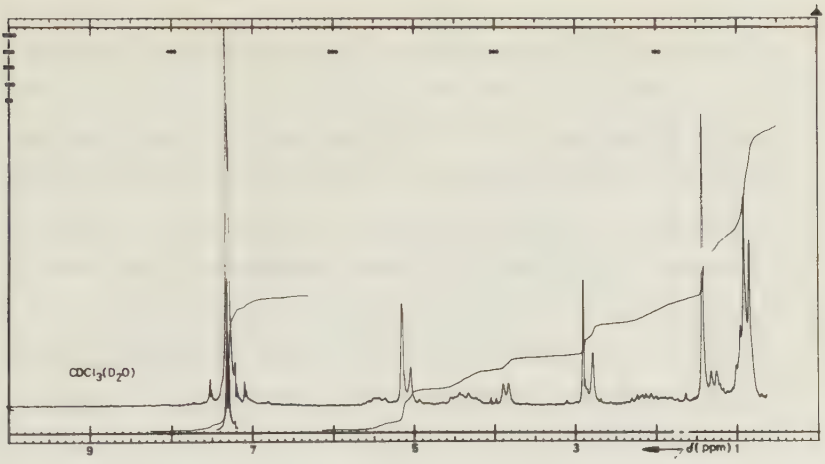


Abbildung 12: 100 MHz-NMR-Spektrum des säulenchromatographisch an neutralem Aluminiumoxid (III,Woelm) gereinigten 53.

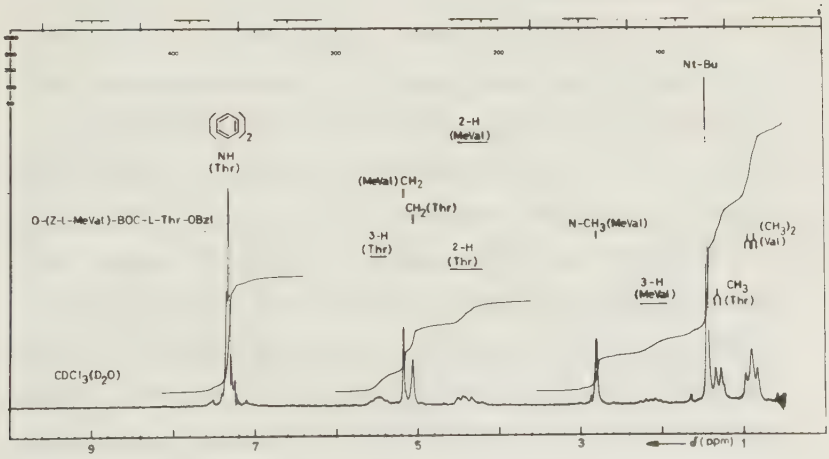


Abbildung 13: 100 MHz-NMR-Spektrum des säulenchromatographisch an neutralem Aluminiumoxid(III) und neutralem Kieselgel (Merck) gereinigten 53.

NMR-Spektrum des Rohproduktes 53 nach der Anhydrid-Kupplung, Abb. 12 das Spektrum nach der Reinigung des rohen 53 an Aluminiumoxid(III) [neutral,"Woelm"], wobei die nicht umgesetzte Säure 18 abgetrennt wurde. Eine Abtrennung von weiteren 30% an Nebenprodukten erreichte ich mit einer Kieselgelsäule ("Merck"), deren Äthylacetat-Eluat das sehr saubere 53 enthielt (Abb. 13). 53 mit $[\alpha]_D^{20}$: -27.7± 2° (c= 5.5 in absol. Äthanol) fiel als farbloses Öl mit 42proz. Ausbeute an und erstarrte nach längerer Zeit zu einer gummiartigen Masse. Analysendaten und das Papierrundchromatogramm (LS VII) vom hydrierten Produkt 56 bestätigten die Einheitlichkeit von 53. Eine analoge Aufarbeitung des Rohproduktes aus der eingangs erwähnten Veresterung von 18 mit 50 in Gegenwart von DCC/Pyridin ergab dann ebenfalls reines 53.

Durch eine langsam verlaufende Hydrierung mit Pd/A-Kohle ließen sich gleichzeitig die Benzylester- und Benzyloxycarbonyl-Gruppen von 53 abspalten. Das entstandene bei 102-110° schmelzende, chromatographisch einheitliche N-BOC-O-(N-methyl-L-valyl)-L-threonin (56) [58] war ein weißes Pulver und konnte trotz mehrfacher Versuche mit unterschiedlichen Lösungsmitteln nicht kristallisiert werden. Die für Proben aus mehreren Ansätzen erhaltenen Drehwerte von 56 mit $[\alpha]_D^{20}$: +32.7 ± 2° (c= 1.27 in Methanol; Lit. [58]: +57.1°) und das Kristallisationsverhalten wichen von den Literaturangaben ab. Hiernach sollte z.B. 56 aus Dimethylformamid oder Acetonitril in Form

farbloser Prismen kristallisieren und bei 208° schmelzen. Im Verlaufe weiterer Untersuchungen gelang es mir tatsächlich, ein nach der Anhydrid-Methode synthetisiertes, aber nicht nach obiger Art säulenchromatographisch gereinigtes 53 zu erhalten, daß nach der katalytischen Hydrierung zu 56 teilweise aus heißem Acetonitril kristallisierte. Der Schmelzpunkt von 199° und der Drehwert mit $[\alpha]_D^{20}$: +52.2 ± 2° (c= 1.1 in Methanol) waren den Literaturdaten [58] ziemlich ähnlich. Im NMR-Spektrum des Produktes zeigten sich aber zwei N-CH_3-Signale vom Methylvalin bei δ = 2.65 sowie 2.67 ppm und im Papierrundchromatogramm (LS VII) wurden mit Ninhydrin zwei Zonen unterschiedlicher Violettfärbung sichtbar, von denen eine mit der von N-Methyl-L-valin gleichlief. Hieraus war zu schließen, daß die Literaturwerte einem Konglomerat aus 56 und N-Methyl-L-valin entstammen mußten.

Die weitere Umsetzung des Depsi-dipeptids 56 zum Tripeptid 58 sollte über einen aktivierten Ester der Aminosäure 4' erfolgen. Von großem Vorteil schien der N-Hydroxysuccinimidester zu sein, der besonders rasch aminolysiert wird, wonach das dabei freigesetzte wasserlösliche N-Hydroxysuccinimid leicht abgetrennt werden kann. Außerdem sind solche Ester wegen ihrer Kristallisationsneigung bekannt, so daß sie vor der Kupplungsreaktion rein isoliert werden können. Als Carboxylkomponente wurde Benzyloxycarbonyl(Z)-sarkosin (45) [66] eingesetzt, das ich quantitativ durch Acylierung von Sarkosin mit Chloramei-

sensäure-benzylester in kristalliner Form erhielt. Seine Umsetzung zum gewünschten Succinimidester 49 erfolgte mit N-Hydroxysuccinimid und DCC in Dioxan bei Raumtemperatur, da bei dem optisch inaktiven Sarkosin keine Racemisierung zu befürchten war. Anders als der Z-Glycin-ester [67] kristallisierte aber der Z-Sarkosin-succinimidester wider Erwarten aus Äthylacetat/Cyclohexan oder Äthylacetat/Petroläther in nur geringer Menge (Schmp. 75°). Da selbst diese laut NMR-Spektrum nicht einheitlich war, prüfte ich, ob sich 58 nicht besser nach der gemischten Anhydrid-Methode darstellen ließ, insbesondere, da ja eine Racemisierung nicht zu befürchten war.

Unter Verwendung von N-Methylmorpholin und Chlorameisensäure-isobutylester wurde Z-Sarkosin (45) mit dem Dipeptid 56 in Tetrahydrofuran/Dimethylformamid bei -7° umgesetzt. Es entstand ein gelbes Harz, das ich zuerst durch Flüssig-Flüssig-Extraktion am "RONOR"-Verteilungsgerät (LS VI: Toluol/Chloroform/Methanol/wasser, 5:5:8:2)[58] von Nebenprodukten befreien wollte. Die Extraktion wurde aber nach zwei Tagen abgebrochen, da mir das Verfahren infolge der großen Lösungsmittelmengen und der langen Extraktionsdauer zu uneffektiv erschien. Die Unterphase wurde daraufhin eingedampft, wobei sich zeigte, daß sie die Hauptmenge der Substanz mitsamt den Verunreinigungen enthielt. Aus Methanol chromatographierte ich dann das rohe 58 an Sephadex LH 20. Ein Fraktionssammler mit angeschlossenem UV-Detektor lieferten ein Elutionsdiagramm,

das fünf verschiedene Fraktionen anzeigte (Abb. 14). Da bei dieser Gelchromatographie höhermolekulare Stoffe schneller die Säule durchwandern als niedermolekulare, mußte eine der vorderen Fraktionen 58 sein. Beim Eindampfen der zweiten Fraktion erhielt ich tatsächlich NMR-spektrometrisch einheitliches Depsi-tripeptid 58 in Form eines weißen Schaumes. Die Drehung war $[\alpha]_D^{20}$: -53.0 ± 2° (c= 1.3 in Methanol; Lit. [58]: -59.7°), die Ausbeute betrug 50% und die Ergebnisse der Elementaranalyse und der potentiom. Titration paßten auf die für 58 berechneten Werte.

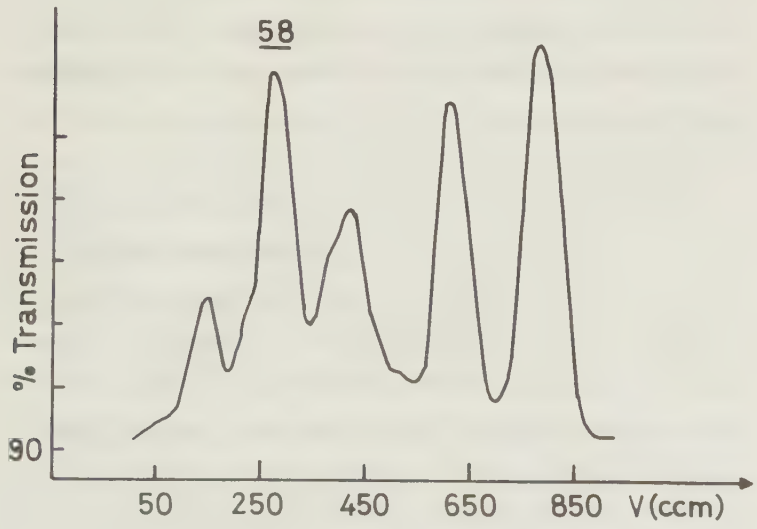


Abbildung 14: Elutionsdiagramm des rohen Depsi-tripeptids 58 nach Chromatographie an Sephadex LH 20.

1.4. Kondensation der Fragmente 58 und 59, Abspaltung der tert.-Butylgruppen und Kupplung des Pentapeptids 61 mit der Actinocinvorstufe 64 zu 65

Die Kondensation der synthetisierten Fragmente 58 und 59 (Schema 4) zum N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-O_{Thr}-(benzyloxycarbonyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl)-L-threonyl-D-valyl-(O-tert.-butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (60) wurde wieder nach der gemischten Anhydrid-Methode unter Verwendung von Chlorameisensäure-isobutylester/Methylmorpholin durchgeführt. Adsorption des Rohproduktes - ein bräunlicher Schaum - aus Benzol an neutralem Aluminiumoxid(III, "Woelm") und Nachwaschen mit Benzol und dann Äthylacetat lieferte als Eindampfrückstand der gewaschenen Äthylacetatfraktion sauberes Pentapeptid 60 (Ausb. 92%).

Um dieses später mit 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoylchlorid (64) [4] (Formelschema S. 67) verknüpfen zu können, mußte aus dem Depsi-pentapeptid 60 die N-terminale tert.-Butyloxycarbonylgruppe von Aminosäure 1' abgespalten werden. Da es zwecks Verhinderung von Nebenreaktionen bei den Folgestufen sinnvoll war, die N-terminale Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe des Sarkosins [4'] in 60 beizubehalten, mußte ein selektiv wirkendes Abspaltungsreagenz benutzt werden. Ich fand nach einigen Versuchen, daß sich die Umsetzung von 60 mit Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur am besten eignete. Dabei

wurden - unter Erhalt der N-Benzyloxycarbonyl-Gruppe - die beiden tert.-Butylgruppen an Aminosäure 3', dem Hydroxyprolinrest, ebenfalls wie gewünscht abgespalten.

Wie in Abschnitt II schon gezeigt, gelingt die Beseitigung von tert.-Butylestergruppen sehr gut mit wasserfreier Trifluoressigsäure. Gleiches gilt nach E. Schnabel und Mitarbeitern [68] für eine tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe, wobei nur flüchtige Nebenprodukte wie Isobuten und Kohlendioxid entstehen. Weniger vollständig erfolgt aber die Abspaltung einer in 60 an Aminosäure 3' noch vorhandenen tert.-Butyläthergruppe. Da ein einheitliches Produkt wünschenswert war, die drei tert.-Butylschutzgruppen in 60 sich aber auch nicht selektiv abtrennen ließen, mußte ein Reagenz gefunden werden, daß - ohne die Benzyloxycarbonylgruppe anzugreifen - alle drei tert.-Butylgruppen gleichermaßen und vollständig abspaltet. Gute Ergebnisse in dieser Richtung waren z.B. mit Bortrifluorid-ätherat [69] in Essigsäure bzw. Essigsäure-Chloroform-Mischungen (1:9) erzielt worden. Dieser BF_3-Komplex führte aber bei 60, wahrscheinlich wegen partieller Acetylierung der Hydroxylfunktion, nicht zum gewünschten Erfolg.

Günstiger schien dagegen die Verwendung von wäßriger Trifluoressigsäure, wobei eine NMR-spektrometrische Kontrolle der Abspaltungsreaktion (Abb. 15 und 16) schließlich die 70proz. Trifluoressigsäure *) als wirksamste

*) Gewichts-Prozente: 100proz. Trifluoressigsäure/D_2O (7:3).

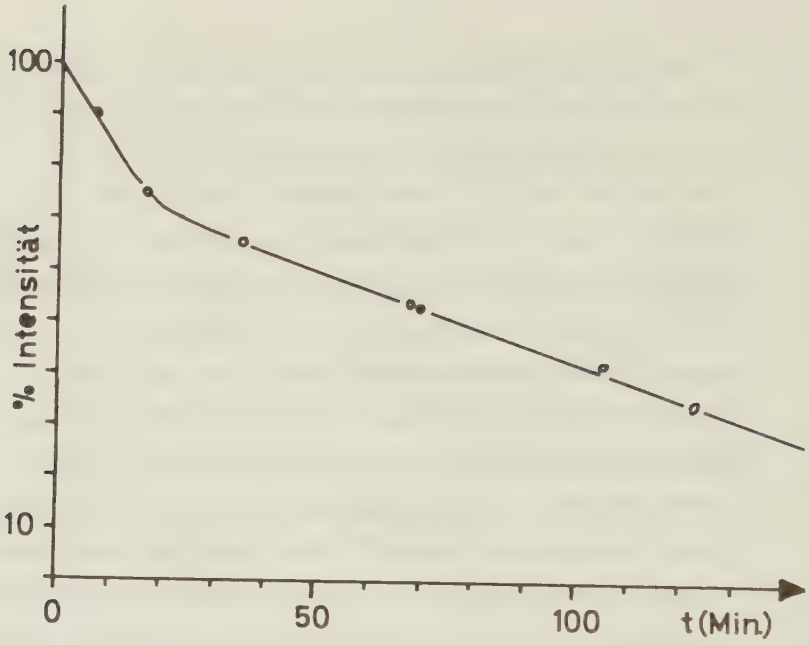


Abbildung 15: Zeitabhängige Intensitätsabnahme der NMR-spektrometrisch gemessenen tert.-Butylester-Signale von 60 in 70proz. Trifluoressigsäure.

Mischung auswies. Die über mehrere Stunden hinweg verfolgte Abnahme der tert.-Butylpeak-Intensitäten zeigte eine besonders große Abspaltungstendenz der Estergruppe (Abb. 15) in den ersten Minuten, dann fiel deren Signalintensität etwa linear ab. Durch Extrapolation konnte ich aus Abb. 15 die Zeit bis zur vollständigen Abspaltung der tert.-Butylestergruppe (3.5 Stdn.) abschätzen. Die beiden anderen tert.-Butylgruppen waren erst nach 36 Stdn. restlos abge-

spalten. Obgleich die NMR-Signale der tert.-Butylgruppen in 70proz. Trifluoressigsäure (Abb. 16) teilweise nur um 3 Hz voneinander entfernt waren, konnten sie zugeordnet werden. Der tert.-Butyläther-peak bei δ = 1.19 ppm war aus Vergleichsspektren (wie z.B. von 52) her bekannt. Die Beobachtung, daß das erste Signal von links (Abb. 16) in dem Maße kleiner wurde wie das dritte von links wuchs, führte zu der in Abb. 16 skizzierten Signalzuordnung. Das auf Kosten des tert.-Butylester-peaks anwachsende Signal, mußte zu dem entstehenden tert.-Butanol gehören, da bei der Abspaltung der tert.-Butyläther-gruppe mit obigem Reagenz kein tert.-Butanol, aber neben Kohlendioxid noch Isobuten entsteht. Der zweite Peak von links war folglich der BOC-Gruppe zuzuordnen.

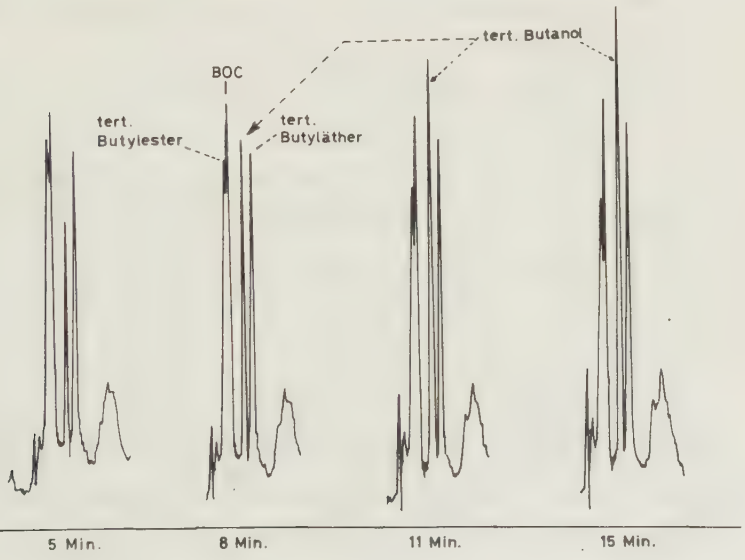


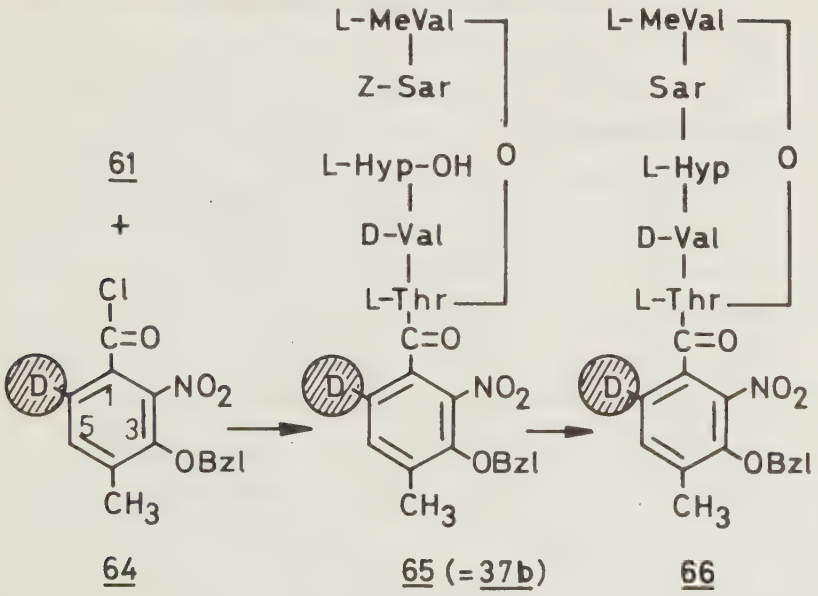
Abbildung 16: Ausschnitte des 100 MHz-NMR-Spektrums von 60 in 70proz. Trifluoressigsäure nach verschiedenen Zeitabständen.

Ob sich 60 bei der 36stdg. Behandlung mit 70proz. Trifluoressigsäure möglicherweise anderweitig zersetzt hatte, zeigte zunächst die papierchromatographische Kontrolle (LS VII)einer Probe 61. Diese gab nur eine ninhydrin-positive Zone. Eventuell anwesendes Ausgangsprodukt 60 ließ sich jedoch wegen Blockierung der Aminofunktionen naturgemäß nicht anfärben. Eine weitere Probe des erhaltenen 61 chromatographierte ich dann an einer Kieselgelplatte (LS II). Während unter der UV-Lampe nur eine Zone zu erkennen war, wurden mit Ninhydrin drei violett gefärbte Zonen sichtbar, wobei die mit kleinstem R_F-Wert die Hauptmenge an 61 enthielt. Diesem Befund zufolge war eine präparative Schichtchromatographie (LS II) des rohen 61 angebracht. Weiterhin ließ sich entnehmen, daß die Benzyloxycarbonyl-Gruppe des Sarkosinrestes die Trifluoressigsäurebehandlung leidlich gut überstanden hatte.

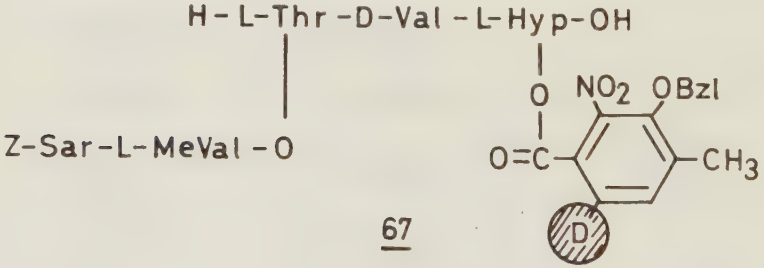
Als Kupplungspartner für 61 und markierte Vorstufe für den späteren Actinomycin-Chromophor synthetisierte ich dann nach bekannten Methoden das 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoylchlorid (64) [4]. Der NMR-spektrometrisch bestimmte Deuterierungsgrad von C-6 fiel bei der Benzylierung des 3-Hydroxyls von 90 auf 80% ab. Da das Depsi-pentapeptid 61 als Salz vorlag, versuchte ich, die Trifluoressigsäure mit Hilfe eines basischen Ionenaustauschers (Dowex 50 WX 4) abzutrennen. Hierzu wurde 61 in Wasser gelöst und an der quarternären Benzylammoniumverbindung des Austauschers adsorbiert. Eluieren mit 0.5 n

Ammoniak und anschließend Wasser führte jedoch zu einem braunen Schaum, der nur noch 50% der aufgetragenen Substanzmenge ausmachte und sich im NMR-Spektrum sowie im Papierchromatogramm (LS VII) als komponentenreiches Gemisch auswies. Daher verzichtete ich auf eine vorherige Abtrennung der Trifluoressigsäure und setzte bei der Kupplung von 61 mit dem Säurechlorid 64 ein zusätzliches Äquivalent Base ein.

Diese Säurechlorid-Kupplung konnte wegen der ungeschützten Carboxy- und Hydroxy-Gruppen von 61 nur in einem hydrophilen Solvens ablaufen, wie Probeansätze in Dioxan/Tetrahydrofuran und Tetrahydrofuran/Äther (1:1) bestätigten. Das entstandene Rohprodukt 65 - ein gelber Schaum - wurde zunächst an Sephadex LH 20-Säulen mit angeschlossenem UV-Detektor aufgetrennt. Die zwei ersten der vier eluier-



ten Fraktionen enthielten die Hauptmenge der Substanz und glichen einander im NMR-Spektrum. Beide ließen sich durch anschließende Schichtchromatographie an Kieselgel mit zwei verschiedenen Lösungsmittelsystemen (LS III,IV) weiter reinigen. Die am schnellsten an Sephadex wandernde Fraktion gab - nach Abtrennung von 14 Zonen - ein Produkt, dessen Drehwert $[\alpha]_D^{21}$: $-9.7 \pm 0.5^\circ$ (c= 1.1 in Methanol) betrug. Es konnte verschiedenen Daten nach ein am Hydroxyprolinrest mit 64 acyliertes Pentapeptid 67 sein. Die zweitschnellste Fraktion, die Hauptmenge, zeigte einen Drehwert von $[\alpha]_D^{21}$: $-1.9 \pm 0.2^\circ$ (c= 1.4 in Methanol) sowie ein NMR-Spektrum, das die Anwesenheit aller fünf Aminosäuren bewies und auf die "Nitrosäure"-pentapeptid-Struktur 65 paßte (Gesamtausbeute: 17%).



67

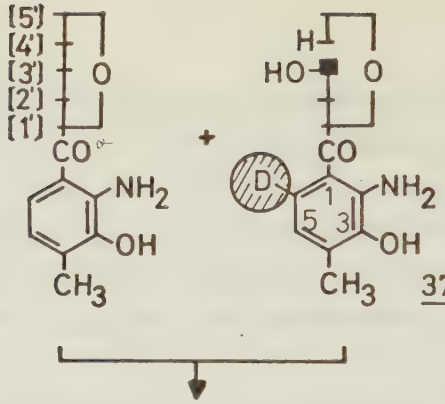
III. 2.1. Oxidative Mischkondensation der beiden Pentapeptid-Derivate 36 und 37a

Die aus den Pentapeptid-Derivaten 35 und 65 (=37b) durch Hydrierung entstehenden N-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptide 36 und 37a (an C-6 deuteriert) sollten bei der Mischkondensation vier verschiedene Reaktionsprodukte geben: Actinomycin C_1 (10=1a), (ß)-$Seco_{(hyp,sar)}$-(3'$_ß$-hyp)-actinomycin C_1 (38), (∝)-$Seco_{(hyp,sar)}$-[8-deutero-(3'$_∝$-hyp)-actinomycin C_1] (39) sowie Bis-$seco_{(hyp,sar)}$-[8-deutero-(3'$_{∝ß}$-hyp)-actinomycin C_1] (40).

Um für die weiteren Umsetzungen möglichst viel von den Seco- und Bis-seco-actinomycinen zu erhalten, setzte ich zur Hydrierung das nach bekannter Methode [9] synthetisierte N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-cyclo-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr}] (35) und das offene Pentapeptid 65 im Verhältnis 1:1.55 ein. Wenn man eine quantitative Kondensation beider Hydrierungsprodukte voraussetzte, war mit einer 10,38,39,40-Ausbeute von 196,304,304 und 471 mg zu rechnen. Die oxidative Mischkondensation von 36 und 37a erfolgte in Methanol/0.07 m Phosphatpuffer pH 7.2 (1:1) mit Kaliumhexacyanoferrat(III), wobei der pH-Wert von 7.2 durch Zugabe von n NaOH stets konstant gehalten wurde.

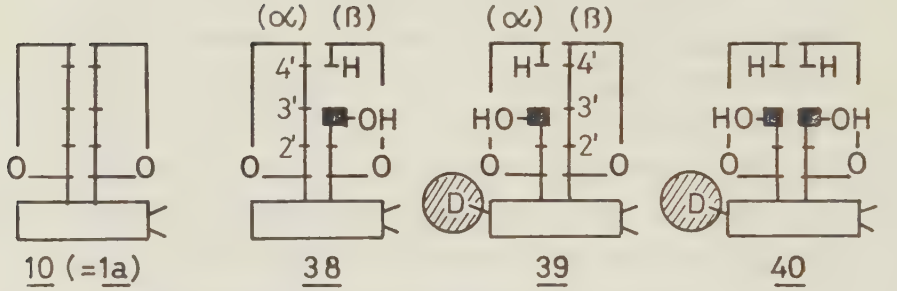
Zur Auftrennung des entstandenen roten Stoffgemisches wurden die eingedampften Butanolextrakte (1.14 g) an einer

SCHEMA 3

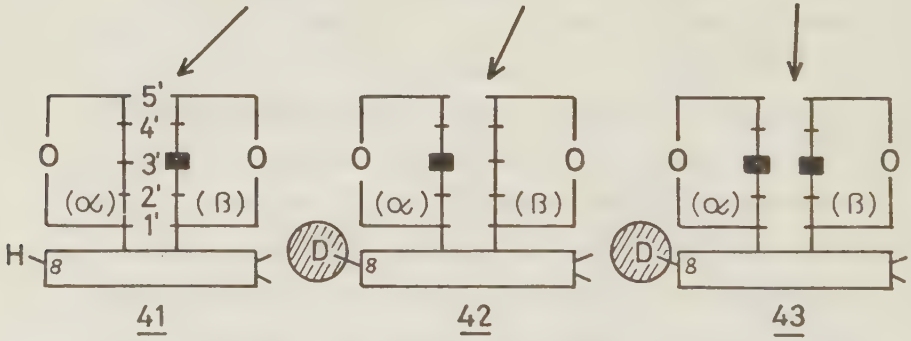


36 37a

b: NO_2 statt NH_2
OBzl statt 3-OH
H = Z



10 (=1a) 38 39 40



41 42 43

Actinomycin $X_{oß}$ Actinomycin i-$X_{oß}$

[1']-[5'] = L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-N-MeVal

= Actinocinyl

■ = L-Hyp (=4-Hydroxy-L-prolyl)

4 x 110 cm-Zellulosesäule (LS VIII: Butanol/Butylacetat/Dibutyläther/Wasser/10proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat, 4:3:1:4:4) chromatographiert. Auf der Säule (Laufzeit 5 Tage) erfolgte eine Trennung in die Zonen I-VI (Bezifferung in Richtung abnehmender R_F-Werte). Das neutrale Actinomycin C_1 (10, Zone I) wanderte am schnellsten. Weniger schnell war die Zone II, deren Inhaltsstoff (36 mg)sich im 30 cm-Papierrundchromatogramm (LS IX) als Zweikomponentengemisch erwies. Die auf das Molgewicht von 38 (MG 1289.5) bezogenen und aus dem Elektronenspektrum errechneten ε-Werte der Absorptionsmaxima lagen, verglichen mit denen anderer Actinocinylpeptide, um ca. 40% zu tief. Ebenfalls ein Zweikomponentengemisch war der gelbrote Inhaltsstoff aus Zone IV, dessen ε-Werte etwa richtig lagen. Die beiden R_F-Werte (LS IX: 1.39, 2.00; bezogen auf Bis-seco-actinomycin C_1 [70]) ähnelten zwar denen der Inhaltsstoffe aus Zone III und V; Fraktion IV war aber kein Gemisch aus diesen beiden. Die geringe Ausbeute (45 mg) machte weitere Trennversuche und eine Identifizierung der Substanzen hinfällig.

Einheitlich im 30 cm-Papierrundchromatogramm (LS IX) erwiesen sich die Stoffe der Zonen III und V, die außerdem mit 125 bzw. 104 mg die Hauptsubstanzmenge darstellten. Ihre UV- und NMR-Spektren deuteten, obgleich die NMR-Signale bei offenkettigen Actinocinylpeptiden in der Regel stark verbreitert sind, auf die Strukturen 38 und 39 hin. Um hier eine Zuordnung treffen zu können, war 64 an C-6

Tab. 4 Produkte der Mischkondensation von 36 und 37a nach chromatographischer Trennung an einer Zellulosesäule

Substanz (Zone)	Schmp. (Zers.)	$[\alpha]_D^{20}$, (c) in Methanol	R-Werte[a]	$\varepsilon_{max}(\lambda_{max})$ in Methanol	Ausbeute [mg]
10 (I)	244-246° (Bipyram.)	-321±10° (0.26)	1.0 [b]	24300 (443.0)	45
38 oder 39 (III)	202-212°	-100±3° (0.28)	2.16	21570 (445.0) 21110 (429.0) 35440 (236.6)	125
39 oder 38 (V)	197-205°	-119±3° (0.17)	1.27	23500 (445.0) 22940 (428.5) 37990 (237.0)	104
40 (VI)	188-194°	-70.5±3° (0.13)	0.44	31660 (444.0) 30990 (425.0) 36175 (238.3)	17

a) Bezogen auf Bis-seco-actinomycin C_1 = 1.0 [70] (LS IX).
b) Bezogen auf Actinomycin C_1 = 1.0 (30 cm-Papierrundchromatogramm, LS X).

deuteriert worden. Von den beiden nach der Mischkondensation entstandenen Seco-actinomycinen konnte nur 39, mit dem offenen Peptid in (α)-Stellung, an C-8 deuteriert sein. Hier fällt das 8-H NMR-Signal aus; das von 7-H erscheint als Singulett. Im Aromatenbereich des NMR-Spektrums hätte

also bei 39 ein Singulett (7-H) und bei 38 ein doppeltes Dublett (7-H, 8-H) auftreten müssen. Die Zuordnung wurde aber leider durch die Unschärfe der NMR-Spektren zunichte gemacht. Auch Versuche, deuterierte Schlüsselbruchstücke massenspektrometrisch bei verschiedenen Temperaturen (200, 220, 260, 300, 350, 400°) zu erfassen und dadurch die Inhaltsstoffe der Zonen III und V zuzuordnen, schlugen fehl. Die bei gleichen Temperaturen für beide Substanzen übereinstimmende Fragmentbildung stützte aber die obigen Befunde, nach denen es sich bei den Fraktionen III und V um die gesuchten isomeren Seco-actinomycine 38 und 39 handelte. Durch deren spätere Cyclisierung erhoffte ich über weitere NMR-Messungen und z.B. den Vergleich mit nativem Actinomycin $X_{o\beta}$ eine genauere Zuordnung; denn nach dem Schließen beider Lactonringe werden die NMR-Spektren in der Regel scharf.

Die auf der Zellulosesäule neben den fünf Zonen abgetrennte uneinheitliche Fraktion VI, in der 40 vermutet wurde, zeigte papierchromatographisch (LS IX) die gleiche Zusammensetzung wie die in der Oberphase des Säulensystems LS VIII unlösliche Restsubstanz (263 mg). Daher wurden beide gemeinsam an einer zweiten Zellulosesäule (LS IX: Butanol/Butylacetat/3proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat, 7:3:10) chromatographiert, auf der eine Trennung in fünf Zonen erfolgte. Erwartungsgemäß war das zwei Carboxyl-, zwei Amino- und zwei Hydroxyl-Gruppen enthaltende 40 Inhaltsstoff der am langsamsten gewanderten Zone. Das unscharfe NMR-Spektrum von 40 half bei der Identifizierung

wenig. Hier diente der Vergleich der analytischen Daten wie IR-Spektrum, R_F-wert und Drehung (Tab.4) mit denen des durch Kondensation von zwei Molekülen 65 erhaltenen 40 zum Nachweis der Struktur. Auch bei dieser Selbstkondensation von 65 entstand 40 - ganz im Gegensatz zu anderen Actinocinyl-bis-peptiden - in bemerkenswert geringer Ausbeute. Eine solche Hemmung der "Dimerisierungs"-Reaktion könnte sowohl von Einflüssen der zusätzlichen Hydroxygruppen (H-Brücken) an Aminosäure 3' als auch besonders von konformativ, d.h. sterisch ungünstigen - z.B. voluminösen - Strukturen der Peptidketten herrühren, die ihrerseits wieder durch das "Aufschneiden" der Peptidringe und die damit entstehenden zwei geladenen $-NH_3^+/-COO^-$-Paare bedingt wären.

2.2. Cyclisierungsversuche zu Actinomycin $X_{o\beta}$ und 8-Deutero-actinomycin i-$X_{o\beta}$

Die Cyclisierung der als Fraktion III und V isolierten Seco-actinomycine 38 und 39 zu den stellungsisomeren aniso-Actinomycinen 41 bzw. 42 hatte nach den Erfahrungen von J. Ammann [70], die bei der Cyclisierung von Bis-seco(sar, meval)-actinomycinen (Ausbeuten bei 55%) gemacht wurden, einige Aussichten auf Erfolg. Daß in meinem Fall die Peptidringe zwischen Hydroxyprolin und Sarkosin aufgeschnitten waren und zusätzliche Hydroxygruppen enthielten, komplizierte die Verhältnisse - allein in Bezug auf eine gün-

stige räumliche Vororientierung der Peptidketten - allerdings beträchtlich. Dies mußte besonders beim Bis-seco$_{(hyp, sar)}$-actinomycin 40 zum Tragen kommen, das noch keinen vorgefertigten Peptidring enthielt und bei dem sich Amidbindungen auch zwischen den (α)- und (ß)-Peptidketten, d.h. interannular ausbilden konnten. Theoretisch war sogar eine Reaktion der aktivierten Carboxygruppen mit den Hydroxylfunktionen der benachbarten Hydroxyprolylreste möglich.

Die Versuche, die Amidbindungen zwischen Aminosäure 3' und 4' zu schließen, erfolgten zunächst an den Mono-seco$_{(hyp,sar)}$-actinomycinen 38 bzw. 39, und zwar mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) unter den von Ammann gefundenen Reaktionsbedingungen. Hierzu löste ich die Substanzen der Zonen III und V in besonders sorgfältig absolutiertem Tetrahydrofuran und versetzte mit einer 12.5 fach molaren Menge DCC. Die drei Tage bei Raumtemperatur gerührten Reaktionslösungen wurden wie üblich aufgearbeitet und die Rohprodukte jeweils an einer 3.5 x 48 cm-Zellulosesäule (LS XI: Butanol/Dibutyläther/10proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat, 1:2:3) chromatographiert. Sie trennten sich dabei in eine rote Zone am Säulenkopf und zwei rascher wandernde Zonen: IIIo und IIIu sowie Vo und Vu (o= kleiner R_F-Wert; u= großer R_F-Wert)

Die Zonen am Säulenkopf wurden nach Aufarbeitung und NMR-spektrometrischer Kontrolle verworfen. Die NMR-Spektren der Stoffe aus den übrigen Zonen waren einander sehr

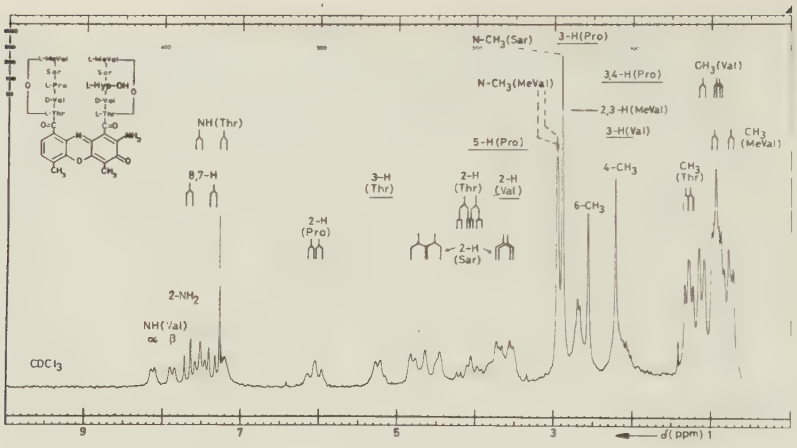


Abbildung 17: 100 MHz-NMR-Spektrum von nativem Actinomycin $X_{o\beta}$ (41) in Chloroform.

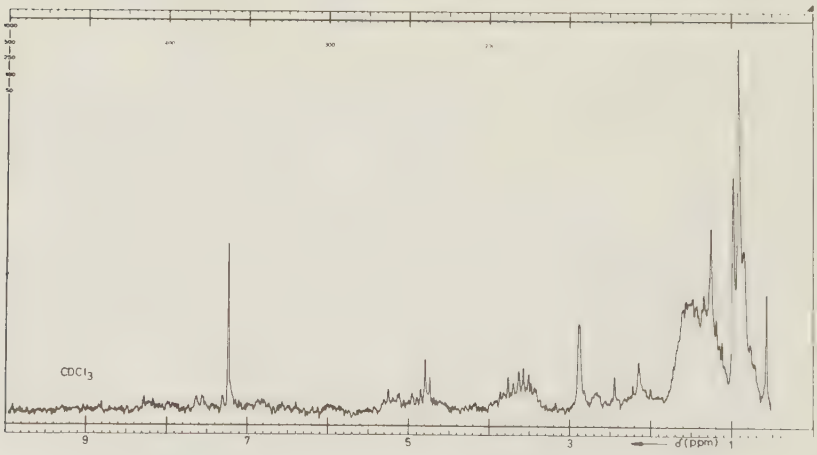


Abbildung 18: 100 MHz-NMR-Spektrum des Cyclisierungsproduktes aus Zone IIIo.

ähnlich (Abb. 18), aber verschieden von dem Spektrum des nativen Actinomycins $X_{oß}$ (41) (Abb. 17). Die Signalschärfe hatte, verglichen mit den Kurven der Ausgangsprodukte erheblich zugenommen, was auf eine erfolgreiche Cyclisierung hindeutete. Der Bereich zwischen δ = 1-2 ppm war jedoch durch ein sehr breites Signal gekennzeichnet (Abb. 18), das von restlichem Dicyclohexylharnstoff oder von nicht amminolysierten Kondensationsprodukten zwischen DCC und den Seco-actinomycinen 38,39 herrühren konnte. Im letzteren, wahrscheinlicheren Fall würde dies bedeuten, daß zwar die freie Carboxygruppe der Seco-actinomycine 38,39 mit DCC reagiert hat, ein Ringschluß jedoch - vermutlich aus sterischen Gründen oder wegen mangelnder Vororientierung der linearen Peptidkette - ausblieb. Ob diese Behinderungen nun durch das Hydroxyl an Aminosäure 3' oder den, im Vergleich zu den von Ammann cyclisierten Bis-seco-actinomycinen, nach Aminosäure 3'/4' verschobenen Reaktionsort bedingt sind, muß derzeit offen bleiben. Infolge der geringen Ausbeuten an Cyclisierungsprodukten waren die NMR-Spektren nicht optimal, so daß die Zuordnung der Produkte anhand ihres Deuteriumgehaltes an C-8 und ihre genaue NMR-Identifizierung nicht möglich waren.

Bemerkenswerterweise fielen aber die bei Actinomycinen besonders strukturspezifischen R_F-Werte von den Cyclisierungsprodukten IIIo,IIIu - im Papierchromatogramm (LS XI) praktisch identisch - mit dem R_F-Wert für Actinomycin $X_{oß}$ zusammen (Tab. 5). Hinzu kam, daß alle Cyclisierungspro-

dukte im Plattentest gegen Bac. subtilis beachtliche Wirksamkeiten entfalteten (Tab. 5). Dies gab umso mehr zu denken, als bekannt ist, daß geringe Variationen im Peptidteil eines Actinomycins oder gar die Öffnung nur eines Peptidringes die biologische Aktivität des Moleküls größtenteils oder völlig auslöscht. Die Befunde insgesamt sollte man zunächst vielleicht so interpretieren, daß bei der Cyclisierung neben Seco-actinomycin/DCC-Kondensationsprodukten, deren R_F-Werte durchaus denen des betreffenden Actinomycins gleichen können, auch intaktes, sich nicht abtrennendes Actinomycin $X_{oß}$ bzw. i-$X_{oß}$ entsteht, welches für die biologische Aktivität der Produkte verantwortlich ist. Für genauere Aussagen müßte die Synthesefolge aufgrund der hier gewonnenen Erfahrungen mit größeren Ansätzen wiederholt werden.

Tab. 5 Biologische Wirksamkeit [a] und R_F-Werte der 38,39-Cyclisierungsprodukte im Vergleich mit Actinomycin C_1 (10)

	$X_{oß}$	IIIo	IIIu	Vo	Vu	C_1
d [cm]	3.7	3.3	2.9	3.3	2.3	4.3
R-Werte [b]	1.0	1.0	1.0	3.5	7.3	1.5

a) Teste gegen Bac. subtilis.
b) Bezogen auf natives Actinomycin $X_{oß}$ [25] = 1.0 (LS XI).
d= Durchmesser der Hemmzonen auf Agar-Platten.

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Im Zusammenhang mit Untersuchungen der Raumstruktur und der biologischen Wirksamkeit von peptidteil-modifizierten Actinomycinen wurde ein Weg zur getrennten Synthese der beiden (α,β)-stellungsisomeren (na,enantio)-Actinomycine C_1 (2,3) ausgearbeitet. Diese enthalten einen natürlich konfigurierten und einen dazu enantiomeren Pentapeptidlactonring. Wesentliche Merkmale dieses Syntheseweges sind:

a) der Aufbau von Pentapeptid-Derivaten mit dem zunächst schlecht zugänglichen N-Methyl-L-valin-tert.-butylester als C-terminale Komponente. Die säurelabile Schutzgruppe kann ohne die Gefährdung einer später in das Molekül hinzukommenden Lactonbindung wieder entfernt werden.

b) die entscheidende Stellungsisomeren-Trennung über die (na,enantio)-Actinomycinsäure-monolacton-ester 7b,8b, wofür die reversible Maskierung der Carboxygruppe der linearen Peptidkette Voraussetzung ist.

c) bemerkenswert geringe Ausbeuten bei der Cyclisierung der freien Actinomycinsäure-monolactone, die die Isolierung von nur einem der beiden (na,enantio)-Actinomycine erlaubte.

Aus allgemeiner Sicht betrachtet, führten die Arbeiten zu einem modifizierten, verfeinerten, im Prinzip sehr leistungsfähigen Syntheseweg für aniso-Actinomycine.

Hierbei kann die für Actinocinyl-Verbindungen unübertroffene Trennwirkung von Zellulosepulversäulen im Vergleich zu früher besser genutzt werden, da die jetzt eingesetzten Lacton-ester 7b,8b die Verwendung weniger polarer Lösungsmittelsysteme gestatten. Bei der nachfolgenden sauren Spaltung der tert.-Butylester sind auch empfindliche Aminosäuren wie Serin, Hydroxyprolin etc. nicht gefährdet. Damit wird der Aufbau der getrennten (α,ß)-Stellungsisomeren zahlreicher aniso-Actinomycin-Paare auch dann möglich, wenn - wie im vorliegenden Fall - die sonst eingesetzten Actinomycinsäure-monolactone nicht trennbar sind. Dies ist z.B. von Bedeutung bei der Synthese isotopenmarkierter aniso-Actinomycine (Konformationsstudien), oder auch von solchen mit ungleichen 4- und 6-Substituenten am Chromophor (Untersuchungen der Bindung an DNA). Die schlechten Ausbeuten bei der Lactonisierung der zweiten Peptidkette sind lediglich eine Folge der "falschen" Konfigurationssequenz in den (enantio)-Peptidketten der (na,enantio)-Verbindungen. Normale Actinomycinsäure-monolactone lassen sich mit 50-60% Ausbeute cyclisieren.

2. Die Synthese von hydroxyprolin-haltigen Actinomycinen, deren Peptidringkonformationen dann mit Hilfe einer zusätzlichen (α,ß)-Peptid/Peptid-Brücke in der "C"-Form (S. 7) gehalten werden sollten, war weitaus schwieriger als zunächst erwartet. Die Probleme begannen bereits bei der Einführung geeigneter Schutzgruppen für das Hydroxy-

prolin. Sie wurden wiederum durch die Ausarbeitung eines neuen Syntheseweges gelöst. Dieser zeichnete sich durch einige markante Punkte aus:

a) eine spezielle Schutzgruppenkombination: Benzyloxycarbonyl-, tert.-Butyloxycarbonyl-, tert.-Butylester- und tert.-Butyläther-Gruppen,

b) die vorweggenommene Knüpfung der Lactonbindung zwischen Aminosäure 5' und 1' (vgl. Schema 4),

c) die Verlängerung dieses Depsipeptids 5'-1' mit Aminosäure 4', dann die Kupplung des entstandenen Tripeptidfragmentes 58 mit einem 2'-3'-Dipeptid (59) zu einem Depsipentapeptid und schließlich dessen Kupplung mit einer Vorstufe des Actinomycin-Chromophors,

d) die oxidative Kondensation zweier solcher Bausteine zu einer Actinomycinvorstufe, in der die späteren Peptidlactonringe zwischen den Aminosäuren 3' und 4' aufgeschnitten sind (Bis-seco$_{(hyp,sar)}$- bzw. Seco$_{(hyp,sar)}$-actinomycine),

e) eine Cyclisierung der Peptidketten durch Knüpfen von Säureamid-Bindungen ähnlich wie bei den schon bekannten Bis-seco$_{(4',5')}$-actinomycinen [70]. Auch diese Cyclisierungen waren durch unerwartet schlechte Ausbeuten gekennzeichnet und führten nur zu einem verunreinigten, bakteriostatisch allerdings gut wirksamen Hydroxyprolin-actinomycin, dem Actinomycin X$_{oß}$. Damit war erstmals ein Actinomycin dieses Typs synthetisiert.

Wenn vor allem die Komplikationen bei der Ringschlußre-

aktion beseitigt sind, dürfte auch dieser Syntheseweg zu Hydroxyprolin-actinomycinen gut gangbar sein und damit besonders interessante Actinomycine mit zusätzlichen freien funktionellen Gruppen liefern. Die geplante Einführung der zweiten Peptid/Peptid-brücke ist wahrscheinlich einfacher, wenn man die Synthese im Sinne des Formelschemas (Abb. 5) nur bis zu den hydroxyprolin-haltigen Cyclopeptiden führt, dann diese über die Aminosäuren 3' verbrückt und erst danach die N-terminalen Acylgruppen zum Actinomycin-Chromophor als zweite (α,ß)-Peptid/Peptid-Brücke kondensiert. Hier sind - vor allem auch in Bezug auf die Länge der 3'-3'-Brücke - noch weitere Untersuchungen nötig.

V. Beschreibung der Versuche

Lösungsmittelsysteme (LS) für die Chromatographie[a]:

LS I : Butanol/Dibutyläther/10proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat (2:3:5)

LS II : Chloroform/Methanol/Eisessig (20:10:1)

LS III : Chloroform/Methanol (20:1)

LS IV : (5:1)

LS V : (20:3)

LS VI : Toluol/Chloroform/Methanol/Wasser (5:5:8:2)

LS VII : Butanol/Eisessig/Wasser/Phenol (5:1:5:2)

LS VIII: Butanol/Butylacetat/Dibutyläther/Wasser/10proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat (4:3:1:4:4)

LS IX : Butanol/Butylacetat/3proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat (7:3:10)

LS X : Butanol/Dibutyläther/10proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat (1:1:2)

LS XI : (1:2:3)

Alle Kresotinatlösungen waren mit m-Kresotinsäure gesättigt.

a) Zellulosepulver (Nr. 123) und Chromatographiepapier (2043 bmgl) von Fa. Schleicher & Schüll, Dassel. Neutrales Kieselgel PF_{254} für Platten von der Fa. Merck, Darmstadt.

Schichtchromatographie: Je 35 g Kieselgel PF_{254} ("Merck") wurden mit 85 g Wasser auf Glasplatten (40 x 20 cm) aufgetragen und die luftgetrockneten Platten 3 Stdn. bei 120° aktiviert.

Neutrales Kieselgel: Für Säulen von Fa. Gebrüder Herrmann, Köln-Ehrenfeld; Kieselgel M, Körnung DIN 60-80, und von Fa. Merck, Darmstadt; Körnung 0.05 - 0.2 mm.

Saures Kieselgel: Neutrales Kieselgel der Fa. Gebrüder Herrmann wurde sechsmal mit Wasser, zuletzt mit dest. Wasser aufgeschlämmt und die feinen Anteile durch Dekantieren der überstehenden Flüssigkeit entfernt. Dann wurde in 0.1n Salzsäure aufgeschlämmt, abgesaugt und bei 110° bis zur Fließfähigkeit getrocknet.

Aluminiumoxid unterschiedlicher Aktivität wurde von Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Woelm, Eschwege bezogen.

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und korrigiert. Die Spektren wurden mit folgenden Geräten aufgenommen: UV/Vis: "Carl Zeiss" DMR 21, NMR: "Varian" A 60, NV 14 und HA 100 (Teramethylsilan als innerer Standard). Drehungen: "Perkin-Elmer" Polarimeter 141. IR: "Perkin-Elmer" 21. Massenspektren: Atlas CH 7.

Ninhydrin-Sprühreagenz wurde von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Puffersystem: Bei der oxidativen Kondensation wurde Phosphatpuffer pH 7.2 nach Sörensen verwendet.

Ionenaustauscher Dowex 50 WX 4 wurde von der Fa. Serva, Heidelberg bezogen.

Benzyloxycarbonyl-D-valin (47): 20.0g (171 mMol) D-Valin wurden in 200 ccm 1n NaOH gelöst und mit 200 ccm Tetrahydrofuran versetzt. In 30 Min. wurden unter Rühren (Vibromischer) und Eiskühlung gleichzeitig 60.0g Chlorameisensäure-benzylester/Toluol(1:1) und 400 ccm 1n NaOH zugetropft. Anschließend wurde noch 4 Stdn. unter Kühlung gerührt und 16 Stdn. bei +6° aufbewahrt. Die Mischung wurde zweimal mit Äther extrahiert, der eingedampfte Ätherextrakt mit 25 ccm 1n NaOH aufgenommen und die Lösung nochmals mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßr. Phasen wurden bei 0° mit konz. Salzsäure bis pH 4 angesäuert. Die Lösung wurde mehrmals mit Äther extrahiert, die Atherphasen zweimal mit je 50 ccm Wasser gewaschen und eingedampft. Es wurde mehrmals mit Aceton nachgedampft. Ich erhielt 30.1 g (70%) eines farblosen zähen Öls, das langsam farnkrautartig kristallisierte.
Schmp. 45 - 51°.

$[\alpha]_D^{20}$: -37.8 ± 2° (c=9.48 in absol. Äthanol).

$C_{13}H_{17}NO_4$ (251.3) Ber. C 62.13 H 6.81 N 5.57
Gef.+) C 61.87 H 6.55 N 5.51

+) 8 Stdn. bei 35° i. Hochvak. getrocknet.

Benzyloxycarbonyl-D-valin-tert.-butylester (51):

7.1g (28.3 mMol) Benzyloxycarbonyl-D-valin (47), 113.2 ccm tert.-Butylacetat und 4.5g 0.1n Perchlorsäure wurden unter gelegentlichem Schütteln 5.5 Tage bei 20° aufbewahrt. Dann wurden 200 ccm Äthylacetat zugegeben, mit gesätt. $NaHCO_3$-Lösung und Wasser mehrmals gewaschen und i. Vak. eingedampft. Es wurde mehrmals mit Chloroform nachgedampft. Ich erhielt 51 als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 83% (7.2g). $[\alpha]_D^{20}$: +15.8 ∓ 0.5° (c= 2.63 in absol. Athanol).

$C_{17}H_{25}NO_4$ (307.4) Ber. C 66.42 H 8.19 N 4.56

Gef.+) C 65.80 H 7.87 N 4.44

+) 7 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

Benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester (20):

Methode A: 8.3g (31.3 mMol) Benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin (18)[37], 57.5 ccm tert.-Butylacetat und 2.3g 0.1n Perchlorsäure wurden unter gelegentlichem Schütteln und unter Verschluß 6.5 Tage bei 20° aufbewahrt. Dann wurden 250 ccm Äthylacetat zugegeben, mit n $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, eingedampft und mit Chloroform mehrmals i. Vak. abgedampft. Ich erhielt ein farbloses dünnflüssiges Öl. Ausbeute: 9.7 g (95%).

Methode B: 4.0 g (30.0 mMol) Benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin[37] wurden in 60 ccm Methylenchlorid p.a. gelöst. Dann wurden 70 ccm über $CaCl_2$ getrocknetes und in eine

Kühlfalle kondensiertes Isobutylen hinzugegeben. Die Mischung wurde bei -10° mit 0.27 ccm (5 mMol) konz. Schwefelsäure versetzt und im zugeschmolzenen Bombenrohr 65 Stdn. bei Raumtemperatur geschüttelt bis die Lösung klar wurde. Nach dem Neutralisieren mit 50 ccm n $NaHCO_3$ wurde die Methylenchlorid-Phase abgetrennt und fünfmal mit je 50 ccm Wasser gewaschen. Das Waschwasser und die $NaHCO_3$-Lösung wurden mit Methylenchlorid rückextrahiert. Die vereinigten und bei 40° i. Vak. eingedampften Methylenphasen ergaben 20 als farbloses, dünnflüssiges Öl mit einer Ausbeute von 70 % (6.8g). $[\alpha]_D^{23}$: -73.3 ± 3° (c= 2.05 in absol. Äthanol).

$C_{18}H_{27}NO_4$ (321.4) Ber. C 67.28 H 8.47 N 4.36
Gef.+) C 67.78 H 8.89 N 4.76

+) 7 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

N-Methyl-L-valin-tert.-butylester (26) [35,40]: 9.7 g (30.2 mMol) Benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester (20) wurden mit 0.7 g 10proz. Pd/A-Kohle in 300 ccm Methanol hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen des Filtrates i. Vak. erhielt ich ein bei 145 - 147° schmelzendes weißes Pulver mit einer Ausbeute von 71 % (4.0 g). $[\alpha]_D^{20}$: +19.4 ± 1° (c= 1.09 in Methanol; Lit.[35]: +5.3° in Chloroform).

$C_{10}H_{21}NO_2$ (187.3) Ber. C 64.12 H 11.30 N 7.48
Gef.+) C 64.63 H 11.18 N 7.31

+) 7 Stdn. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

Sarkosin-methylester-hydrochlorid (17): 10.0 g (112.3 mMol) Sarkosin wurden in 150 ccm Methanol p.a. gelöst und unter Einleiten von Salzsäuregas 2 Stdn. am Rückfluß gekocht. Es wurde i. Vak. eingeengt, mit Methanol neu versetzt und nochmals 2 Stdn. lang verestert. Der Eindampfrückstand, der mit wenig Methanol p.a. gelöst wurde, kristallisierte teilweise nach Zugabe von Äthylacetat.
Die Hauptmenge wurde ausgefällt, indem die Methanol/Äthylacetat-Lösung unter Rühren in trockenen Äther gegossen wurde. Nach 2 Stdn. im Eisschrank war der Ester 17 in Form eines weißen, flockigen bei 94° schmelzenden Niederschlages ausgefallen. Die Ausbeute betrug 91 % (14.3 g).

$C_4H_{10}NO_2]Cl$ (139.6)

Ber.	C 34.42	H 7.22	N 10.04	Cl 25.40	OCH_3 22.23
Gef.+)	C 33.54	H 7.36	N 10.24	Cl 26.19	OCH_3 21.93

+) 7 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin-methylester (22):
Zu 11.06 g (45.7 mMol) Formyl-D-valyl-L-prolin (21)[9] und 6.37 g (45.7 mMol) Sarkosin-Methylester-hydrochlorid (17) in 150 ccm Methylenchlorid gab ich 6.31 ccm Triäthylamin und bei 0° 10.3 g (50.0 mMol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Es wurde 2 Stdn. bei 0° und 16 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Absaugen des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes (DCCH) wurde mit n HCl, n $NaHCO_3$ und angesäuertem (2 n HCl) Wasser gewaschen.

Der i. Vak. erhaltene Eindampfrückstand wurde in wenig Aceton gelöst und 1 Stde. im Eisschrank aufbewahrt. Der auskristallisierte restliche Harnstoff (DCCH) wurde abfiltriert und das Aceton abgedampft. Zurück blieb eine ölige, gelbe Flüssigkeit, die in wenig Benzol gelöst und an einer 3 x 20 cm-Säule aus mit Benzol eingeschlämmtem saurem Kieselgel chromatographiert wurde. Die Nebenprodukte wurden mit Benzol, der Ester 22 - ein farbloses Öl - mit Äthylacetat eluiert. Die Ausbeute betrug 56 % (8.4 g).

$[\alpha]_D^{22}$: -8.4 ± 1° (c= 1.4 in absol. Äthanol).

$C_{15}H_{25}N_3O_5$ (327.4)

Ber. C 55.03 H 7.69 N 12.83 OCH_3 9.48

Gef.+) C 54.85 H 7.74 N 12.75 OCH_3 9.15

+) 7 Stdn. bei 46° i. Hochvak. getrocknet.

D-Valyl-L-prolyl-sarkosin-methylester-hydrochlorid (23): 8.3 g (25.4 mMol) Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin-methylester (22) wurden mit 78.5 ccm 1.5 n methanol. Salzsäure 16 Stdn. bei 20° unter Druckverschluß gehalten. Anschließend wurde i. Vak. eingedampft und mit 100 ccm Wasser aufgenommen. Es folgte eine Dreistufenverteilung zwischen Äthylacetat und Wasser. Die vereinigten wäßr. Phasen wurden bei 40° i. Vak. zehnmal mit Wasser und sechsmal mit Aceton p.a. abgedampft. Der erhaltene weiße Schaum wurde über frischem KOH getrocknet. Die Ausbeute betrug 96 %.

$[\alpha]_D^{20}$: -86.6 ± 2° (c= 2.81 in Methanol).

$C_{14}H_{25}N_3O_4]$ Cl (334.8)

Ber. C 50.22 H 7.52 N 12.55 Cl 10.59

Gef.+) C 51.72 H 8.10 N 12.34 Cl 10.60

+) 8 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin-methylester (24): 5.7 g (17.0 mMol) D-Valyl-L-prolyl-sarkosin-methylester-hydrochlorid (23) wurden in 60 ccm Wasser und 100 ccm Tetrahydrofuran gelöst und bei 0° und unter Rühren abwechselnd in kleinen Anteilen mit 71 g in 280 ccm Wasser gelöstem $NaHCO_3$ und 11.5 g Benzyloxycarbonylchlorid (33.7 mMol) in Toluol (1:1) versetzt. 5 Stdn. wurde bei 0° gerührt und die Lösung anschließend 12 Stdn. im Eisschrank aufbewahrt. Das feste $NaHCO_3$ wurde abfiltriert und mit wenig Äther gewaschen. Die Lösung wurde zweimal mit je 60 ccm Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden abgedampft und ergaben ein Öl. Dieses wurde aus Benzol an einer 3 x 14 cm-Säule aus Aluminiumoxid (II - III; "Merck") adsorbiert. Nachwaschen mit Benzol entfernte die Nebenprodukte. Das Äthylacetat-Eluat beinhaltete nach NMR-spektrometrischer Untersuchung den gesuchten Ester 24. Die eingedampfte Äthylacetat-Fraktion ergab ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 2.7 g (37 %) und einer spezifischen Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: -22.1 ± 1° (c= 1.28 in absol. Äthanol).

$C_{22}H_{31}N_3O_6$ (433.5)

Ber. C 60.95 H 7.15 N 9.69 OCH_3 7.15

Gef.+) C 60.80 H 7.32 N 9.76 OCH_3 6.91

+) 7 Stdn. bei 45° i. Hochvak. getrocknet.

D-Valyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester-hydrochlorid (30): 15.5 g (38.4 mMol) Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (29) [9] wurden in 72.5 ccm 1.1 n benzylalkoholischer Salzsäure gelöst. Die Lösung wurde verschlossen bei 37° 30 Stdn. aufbewahrt. Anschließend erfolgte eine Verteilung über 3 Stufen zwischen Äthylacetat und Wasser. Die wäßr. Phasen wurden i. Vak. bei 40° eingedampft und restliche Salzsäure durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser und Aceton verjagt. Nach Trocknung über KOH hinterblieb 30 als weißer hygroskopischer Schaum in einer Ausbeute von 13.3 g (84 %).

$[\alpha]_D^{19}$: -48.0 ± 2° (c= 2.49 in absol. Äthanol).

$C_{20}H_{30}N_3O_4]Cl$ (411.9)

Ber. C 58.32 H 7.34 N 10.20 Cl 8.61

Gef.[+] C 58.15 H 7.20 N 10.11 Cl 8.67

[+] 12 Stdn. bei 35° i. Hochvak. getrocknet.

D-Valyl-L-prolyl-sarkosin-hydrochlorid (31): 17.0 g (41.3 mMol) 30 wurden in 300 ccm Methanol/Wasser (20:1) gelöst und mit 0.5 g 10proz. Pd/A-Kohle hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung i. Vak. eingedampft. Ich erhielt einen über KOH getrockneten sehr hygroskopischen weißen Schaum in quantitativer Ausbeute.

$[\alpha]_D^{21}$: -84.3 ± 2° (c= 1.95 in absol. Äthanol).

$C_{13}H_{24}N_3O_4]Cl$ (321.9)

Ber. C 48.52 H 7.52 N 13.06 Cl 11.02

Gef.[+] C 48.87 H 7.83 N 13.29 Cl 11.21

[+] 7 Stdn. bei 46° i. Hochvak. getrocknet.

Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin (25):

Methode A: Zu 2.3 g (5.3 mMol) 24 in 25 ccm Dioxan und 25 ccm Aceton wurden unter Rühren und Eiskühlung innerhalb 15 Min. 6 ccm n NaOH zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 45 Min. gerührt und anschließend mit 50 ccm Wasser verdünnt. Nicht umgesetzter Ester (24) wurde mit Chloroform extrahiert. Es wurde mit konz. Salzsäure auf pH 4 angesäuert und mit Äther extrahiert. Der Eindampfrückstand - ein weißer Schaum - erwies sich ebenfalls als unverseifter Ester (24). Erst nach stärkerem Ansäuern bis pH 1 - 2 konnte die Säure 25 aus der wäßr. Phase mit Äther extrahiert werden. Der eingedampfte Ätherextrakt wurde i. Vak. der Ölpumpe zu einem weißen Schaum, der über KOH getrocknet wurde. Ich erhielt die bei 72 - 76° schmelzende Säure 25 in einer Ausbeute von 1.5 g (70 %).

Methode B: 5.0 g (15.5 mMol) D-Valyl-L-prolyl-sarkosin-hydrochlorid (31) wurden in 35 ccm Wasser gelöst und mit 60 ccm Tetrahydrofuran versetzt. Dann wurde auf 0° gekühlt und unter Rühren (Vibromischer) abwechselnd in kleinen Anteilen eine gesättigte Lösung von 60 g $NaHCO_3$ in 300 ccm Wasser sowie 18.0 g Chlorameisensäure-benzylester (52.9 mMol) in Toluol (1:1) zugegeben. Unter Kühlung wurde noch 6 Stdn. gerührt. Die Lösung wurde 12 Stdn. im Eisschrank aufbewahrt, das feste $NaHCO_3$ abfiltriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Das Tetrahydrofuran wurde i. Vak. abgezogen, und die Lösung mit 50 ccm Chloroform extrahiert.

Anschließend wurde die wäßr. Phase mit konz. Salzsäure unter Kühlung bis pH 2 angesäuert und dreimal mit je 50 ccm Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden mit 20 ccm Wasser gewaschen. Beim Eindampfen i. Vak. bildete sich ein weißer Schaum, der über KOH getrocknet wurde. Ausbeute: 3.6 g (55 %) *). Die potentiom. Titration mit 0.1 n NaOH in Methanol/Wasser (1:1) ergab als Äquiv.-Gew. 425. $[\alpha]_D^{21}$: -25.0 ± 1° (c= 0.73 in Methanol).

$C_{21}H_{29}N_3O_6$ (419.5) Ber. C 60.13 H 6.94 N 10.02

Gef.+) C 59.52 H 7.14 N 10.03

+) 8 Stdn. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester (27) [40]: 3.0 g (7.16 mMol) Benzyloxycarbonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin (25) und 1.34g (7.16 mMol) N-Methyl-L-valin-tert.-butylester (26) wurden in 150 ccm Methylenchlorid gelöst. Unter Rühren gab ich bei 0° portionsweise 1.55 g (7.5 mMol) DCC in wenig Methylenchlorid hinzu. Es wurde 2 Stdn. bei 0° und 12 Stdn. bei 20° gerührt und der ausgefallene Harnstoff (DCCH) dann abfiltriert. Die organische Phase wurde mit n $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, i. Vak. eingedampft und der Rückstand in wenig Aceton p. a. gelöst. Nach 2 Stdn. im Eisschrank war der restliche Harnstoff ausgefallen. Er wurde abfiltriert und die Lösung eingedampft. Der Eindampfrückstand wurde aus Benzol an einer 2.7 x 23 cm-Säule aus Aluminiumoxid (II - III; "Merck") adsorbiert. Es wurde mit Benzol,

*) Wie sich in nachfolgenden Reaktionen herausstellte, war der verwendete Chlorameisensäurebenzylester zum größten Teil zersetzt.

Äthylacetat und Methanol eluiert. Der Eindampfrückstand der mit Wasser gewaschenen Äthylacetatfraktion ergab 27 einer Ausbeute von 3.0 g (71 %) als ein elektrostatisch aufgeladenes Pulver, das über KOH getrocknet wurde.

Schmp. 56 - 62°.

$[\alpha]_D^{21}$: -72.1 ± 3° (c= 0.47 in Meth.; Lit.[40]: -75.3° Äthanol)

$C_{31}H_{48}N_4O_7$ (588.7) Ber. C 63.32 H 7.22 N 9.52

Gef.+) C 63.76 H 7.32 N 9.60

+) 8 Stdn. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester (28) [40]: 3.0 g (5.1 mMol) 27 wurden in 250 ccm Methanol gelöst und mit 0.4 g 10proz. Pd/A-Kohle aushydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung i. Vak. eingedampft. An der Ölpumpe bildete sich 28 als weißer Schaum, der über KOH getrocknet wurde.

Ausbeute: 2.3 g (96%).

$[\alpha]_D^{21}$: -126.3 ± 3° (c= 0.86 in Meth.; Lit.[40]: -125.2°).

$C_{23}H_{42}N_4O_5$ (454.6) Ber. C 60.77 H 9.31 N 15.52

Gef.+) C 60.69 H 9.36 N 15.43

+) 10 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butyl-ester (34): 1.9 g (4.91 mMol) N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin (33) [ ] wurden in 15 ccm Nitromethan gelöst. Hinzu gab ich 0.67 ccm (4.91 mMol) Triäthylamin und 1.28 g (5.0 mMol) N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat (Woodward's Reagens [41]) und rührte 8 Min. bei 20° bis die Lösung fast klar war. Dann wurden 1.78 g (3.93 mMol) 28 in 20 ccm Nitromethan gelöst hinzugegeben. Es wurde 12 Stdn. bei 20° gerührt, die klare Lösung bei 40° i. Vak. eingedampft und der in Chloroform gelöste Rückstand mit 1 m Citronensäure, n $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen. Der Eindampfrückstand wurde aus Chloroform/Benzol (1:4) an vier 1.5 x 9 cm-Säulen aus Aluminiumoxid (IV; "Merck") adsorbiert. Nachwaschen mit 400 ccm Chloroform/Benzol (1:4) entfernte die Hauptmenge der Nebenprodukte. Die gesuchte Substanz gelangte überwiegend durch Eluieren mit Äthylacetat ins Filtrat. Die Methanolfraktion enthielt fast nur noch Nebenprodukte. Die in Chloroform aufgenommenen Verdampfungsrückstände der Äthylacetat-Filtrate wurden mit angesäuertem (Citronensäure) Wasser gewaschen, filtriert und eingedampft. Ich erhielt 1.2 g 34 als blaßgelben Schaum mit Zers. 100 - 105° (Ausb. 38 %).

$[\alpha]_D^{20}$: -42.6 ± 2° (c= 1.0 in Methanol).

$C_{42}H_{60}N_6O_{11}$ (824.9) Ber. C 61.15 H 7.33 N 10.19

Gef.[+] C 61.04 H 7.25 N 10.27

[+] 10 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

Oxidative Mischkondensation von 4d und 5b zu Actinomycin C_1-säure-di-tert.-butylester (6b), 8-Deutero-actinocinyl-(∝)-[cyclo-(D-threonyl-L-valyl-D-prolyl-sarkosyl-N-methyl-D-valyl-O_{Thr})]-(ß)-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester](7b) sowie Actinocinyl-(∝)-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-tert.-butylester]-(ß)-[cyclo-(D-threonyl-L-valyl-D-prolyl-sarkosyl-N-methyl-D-valyl-O_{Thr})](8b) und 8-Deutero-enantio-actinomycin C_1 (9) [31]: 237 mg (0.315 mMol) N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-cyclo-[D-threonyl-L-valyl-D-prolyl-sarkosyl-N-methyl-D-valyl-O_{Thr}](5b) [31] und 787 mg (0.95 mMol) 4d (Verhältnis 1:3) wurden in 100 ccm Methanol gelöst und mit 10proz. Pd/A-Kohle hydriert. Das Gemisch wurde auf 10 ccm eingeengt und mit 100 ccm Methanol/0.07 m Phosphatpuffer pH 7.2 (1:1) versetzt. Die oxidative Kondensation gelang mit 1.25 g in wenig Puffer gelöstem, auf einmal unter Rühren hinzugegebenem Kaliumhexacyanoferrat (III) bei 20° und pH 7.2 (mit 0.2 n NaOH stets nachreguliert). Nach 19 stdg. Rühren extrahierte ich die rote Reaktionsmischung mit 240 ccm Chloroform/Butanol (3:1), wusch den Extrakt mit Wasser und chromatographierte den Eindampfrückstand (1.1 g) an einer 4 x 113 cm-Zellulosesäule (LS I, Laufzeit 9 Tage). Auf der Säule entstanden fünf rote Zonen und am Säulenkopf vier schmale weniger intensiv rot gefärbte, die nicht weiter aufgearbeitet wurden.

Die Zonen 1 und 2 (Bezifferung in Richtung abnehmender R_F-Werte) wanderten vollständig durch die Säule und wurden als getrennte Fraktionen aufgefangen und aufgearbeitet. Durch Schütteln mit gesätt. $NaHCO_3$-Lösung wurde ihnen die Kresotinsäure entzogen. Die organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, filtriert und eingedampft. Die Eindampfrückstände wurden in wenig Benzol gelöst und mit n-Pentan im Zentrifugenglas ausgefällt. Es wurde zentrifugiert und die gelben Oberphasen abdekantiert. Nach nochmaliger Umfällung erhielt ich rote amorphe Produkte. Der Inhaltsstoff von Zone 1 mit einer Ausbeute von 180 mg und einer spezifischen Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: -66.1 ± 2° (c= 0.20 in Methanol) erwies sich als Nebenprodukt (s. Seite 29).

Der Inhaltsstoff von Zone 2 wurde aus Chloroform an einer 3.5 x 12 cm-Säule aus Aluminiumoxid(IV) adsorbiert. Nebenprodukte wusch ich mit Chloroform herunter. Den Actinomycin C_1-säure-ester (6b) eluierte ich mit Methanol. Der mit Chloroform aufgenommene Eindampfrückstand des Eluates wurde mit Wasser gewaschen, filtriert und mit n-Pentan im Zentrifugenglas ausgefällt. Das erhaltene rotgelbe Pulver war der Actinomycin C_1-säure-di-tert.-butylester (6b), was durch nachfolgende Cyclisierung zu Actinomycin C_1 (10)[9] bewiesen wurde.

6b (Zone 2): 180 mg. Schmp. (Zers.) 137 - 140°.

$[\alpha]_D^{18}$: -86.2 ± 3° (c= 0.41 in Methanol).

$C_{70}H_{106}N_{12}O_{18}$ (1403.7) Ber. C 59.89 H 7.61 N 11.97
Gef.+) C 60.11 H 7.06 N 11.52

+) 50 Stdn. bei 95° i. Hochvak. getrocknet.

Die Zonen 3, 4 und 5 wurden aus der Zellulosesäule herausgeschnitten. Ihre Methanol/Wasser-Eluate wurden mit 400 ccm Wasser verdünnt und mit Chloroform/Butanol (4:1) extrahiert. Die Extrakte wurden mit n $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, filtriert und i. Vak. eingedampft. Die roten Eindampfrückstände wurden aus Chloroform mit n-Pentan gefällt, zentrifugiert, umgefällt und bei 95° i. Hochvak. 16 Stdn. getrocknet. Mit Hilfe der Drehwerte, der R_F-Werte und mit UV- und NMR-Messungen gelang die Substanzzuordnung der einzelnen Zonen (vgl. Tab. 1).

8b (Zone 3): 40 mg. Schmp. (Zers.) 139 - 147°

$[\alpha]_D^{18}$: -57.6 ± 6° (c= 0.44 in Methanol).

Auf der Zellulosesäule waren die Zonen 4 und 5 nicht eindeutig durch Zerschneiden zu trennen. Die aufgearbeitete Zone 4 zeigte im Papierrundchromatogramm (LS I) eine Abtrennung von Beimengungen der Zone 5. Daher wurde der Inhaltsstoff der Zone 4 nochmals an einer 3.5 x 75 cm-Zellulosesäule mit obigem LS I chromatographiert. Ich erhielt zwei gut getrennte Zonen, die wie oben aufgearbeitet wurden. Der Inhaltsstoff der Zone 4 konnte mit Hilfe der oben erwähnten Messungen und seines Verhaltens bei der Lactonisierung als 8b/9-Gemisch (Verhältnis 2:1) identifiziert werden.

8b/9 (Zone 4): 53 mg. Schmp. (Zers.) 197 - 203°

$[\alpha]_D^{20}$: +193.5 ± 5° (c= 0.32 in Methanol).

7b (Zone 5): 1.5 mg. Schmp. (Zers.) 184 - 185°.
$[\alpha]_D^{20}$: +71.0 ± 6° (c= 0.26 in Methanol).
$C_{66}H_{95}DN_{12}O_{17}$ (1330.6) Ber. C 59.57 H 7.20
Gef.+) C 59.50 H 7.26

+) 50 Stdn. bei 95° i. Hochvak. getrocknet.

Actinomycin C_1-säure (6a) [9], 8-Deutero-actinocinyl-(∝)-[cyclo-(D-threonyl-L-valyl-D-prolyl-sarkosyl-N-methyl-D-valyl-O_{Thr})]-(ß)-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin] (7a) und Actinocinyl-(∝)-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin]-(ß)-[cyclo-(D-threonyl-L-valyl-D-prolyl-sarkosyl-N-methyl-D-valyl-O_{Thr})] (8a): 170 mg (0.1238 mMol) Actinomycin C_1-säure-di-tert.-butylester (6b), 85 mg (0.0646 mMol) 7b und 32 mg (0.024 mMol) 8b wurden jeweils mit je 15 ccm 100proz. Trifluoressigsäure versetzt und 20 Min. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Eindampfrückstände wurden in Chloroform gelöst, je dreimal mit Wasser gewaschen und eingedampft. Die Rückstände wurden aus Chloroform/Aceton (4:1) jeweils an einer 2 x 15 cm-Säule aus saurem Kieselgel adsorbiert. Die Hauptmengen der Nebenprodukte wusch ich mit Chloroform/Aceton(4:1) von den Säulen. Die gesuchten Actinocinyl-peptide eluierte ich jeweils mit Methanol. Die Methanol-Chargen wurden i. Vak. eingedampft, mit Chloroform aufgenommen, filtriert und zweimal mit angesäuertem (2 n HCl) Wasser gewaschen. Aus den eingeengten Chloroform-Phasen fällte ich die Actinomycin-Vorstufen 6a,

7a mit n-Pentan und 8a mit Petroläther. Die Fällungsprodukte wurden 19 Stdn. bei 103° i. Hochvak. getrocknet.

Aus Actinomycin C_1-säure-di-tert.-butylester (6b) erhielt ich 114 mg (Ausb. 71%) bei 181 - 186° schmelzendes gelbrotes Pulver, das in allen Daten wie R_F-Wert, Drehung, Schmp., Extinktion und dem Äquiv.-Gew.++) von 660 (ber. 645.7) mit Actinomycin C_1-säure (6a) [9] übereinstimmte. $[\alpha]_D^{20}$: -118.0 ± 5° (c= 0.21 in Methanol; Lit.[9]: -121°).

$C_{62}H_{90}N_{12}O_{18}$ (1291.5) Ber. C 57.66 H 6.97 N 13.01

Gef.+) C 57.31 H 6.89 N 12.87

+) 25 Stdn. bei 105° i. Hochvak. getrocknet.

++) Potentiom. Titration mit 0.02 n NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

Aus 7b erhielt ich 72 mg (Ausb. 87%) bei 195 - 203° schmelzendes gelbrotes Pulver, das sich aufgrund von UV- und NMR-spektrometrischen Untersuchungen (Tab. 2) und der nachfolgenden Cyclisierung zu 11 als 7a erwies. $[\alpha]_D^{18}$: +33.0 ± 2° (c= 0.31 in Methanol).

Aus 8b erhielt ich 17 mg (Ausb. 56%) eines bei 171-179° schmelzenden roten Pulvers mit gleichen Absorptionsmaxima wie 7a (vgl. Tab. 2), aber mit einem von 7a im Vorzeichen und in der Größe abweichenden Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$: -68.8 ± 3° (c= 0.29 in Methanol). Im 30 cm-Papierrundchromatogramm (LS VIII) erfolgte eine Auftrennung in zwei Zonen, wovon die schneller laufende wegen der Herkunft und des mit dem von 7a übereinstimmenden R_F-Wertes das nicht von 7a trennbare (α,ß)-Stellungsisomere 8a sein mußte.

Cyclisierung von 6a und 7a zu Actinomycin C_1 (10)[9] und 8-Deutero-(β_{na}, α-enantio)-actinomycin C_1 (11):

a) Herstellung der Reaktionsmischung [9]: Zu 14.3 g Imidazol in 175 ccm wasserfreiem Tetrahydrofuran gab man unter Rühren bei 30° 7.45 ccm Acetylchlorid, rührte 1 Stde. bei 55° und saugte rasch vom weißen Niederschlag ab. Das warme Filtrat wurde unter Rühren mit weiteren 11.2 ccm Acetylchlorid versetzt, noch 1 Stde. bei 55° gerührt und anschließend vom hellgelben Niederschlag in einen auf 55° vorgewärmten Meßzylinder dekantiert.

b) Cyclisierung: 96 mg (0.074 mMol) 6a von Zone 2, 70 mg (0.0565 mMol) 7a von Zone 5 und 27 mg (0.0212 mMol) 8a von Zone 4 (dargestellt durch Abspaltung der tert.-Butylgruppe aus 53 mg 8b mit 100proz. Trifluoressigsäure und Aufarbeitung wie 7a) wurden bei 55° jeweils in 20 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst und mit je 175 ccm Reagenzlösung versetzt. Die Mischung hielt ich 2 Stdn. auf 55°, dampfte vorsichtig i. Vak. ein und löste die Rückstände in Chloroform und Wasser. Es wurde zweimal mit angesäuertem (2n HCl) Wasser gewaschen. Die Eindampfrückstände wurden aus Benzol, 7a von Zone 5 aus Benzol/Chloroform (10:1), jeweils an einer 2 x 12 cm-Aluminiumoxid-(IV)-säule adsorbiert, wobei weiteres Benzol bzw. Benzol/Chloroform farblose Nebenprodukte entfernte. Die roten Substanzen wurden mit Äthylacetat bzw. Methanol in folgenden Mengen eluiert; Produkte von Zone 2: 67 und 93 mg; Produkte von Zone 4: 1 und 44 mg; Produkte von Zone 5: 27 und 105 mg. Da aufgrund

NMR-spektrometrischer Untersuchungen die cyclisierten Produkte in den Äthylacetat-Fraktionen vermutet wurden und die Mengen der eingedampften Säuleneluate verglichen mit den eingesetzten Substanzmengen noch große Verunreinigungen anzeigten, wurden die Äthylacetat-Fraktionen nochmals jeweils aus Methanol an einer 3.5 x 195 cm-Säule aus Sephadex LH 20 chromatographiert. Die Eindampfrückstände wurden in wenig Chloroform gelöst, mit n-Pentan gefällt und 12 Stdn. bei 103° i. Hochvak. getrocknet.

Die rote aus 6a cyclisierte Substanz stimmte nach dem Kristallisieren aus Äthylacetat/Cyclohexan in allen Daten wie NMR- und UV-Spektren, spezifischer Drehung, R_F-Wert und Schmp. mit denen von Actinomycin C_1 (10) [9] überein.

Die orange-rote, aus Zone 5 erhaltene Substanz wurde 16 Stdn. bei 103° i. Hochvak. getrocknet und nach NMR-spektrometrischen Messungen als 11 identifiziert.
Ausbeute: 16 mg. Schmp. (Zers.) 180 - 181°
$[\alpha]_D^{20}$: -18.5 ± 1° (c= 0.22 in Methanol).
Bakteriostatische Wirksamkeit: Im Verdünnungsreihentest unwirksam gegen Bac. subtilis.

4-Hydroxy-L-prolin-methylester-hydrochlorid [50]: 5.0 g (38.2 mMol) 4-Hydroxy-L-prolin wurden in 130 ccm Methanol aufgenommen und nach 10 Min. langem Einleiten von trockenem Salzsäuregas 2 Stdn. im Rückfluß gekocht. Dabei ließ man weiterhin wenig Salzsäuregas in die Lösung einströmen. Der Eindampfrückstand wurde in frischem Methanol p.a. gelöst und noch zweimal auf gleiche Weise verestert. Nach abermaligem Abdampfen i. Vak. wurde in möglichst wenig Methanol gelöst und mit Äther ausgefällt. Ich erhielt einen weißen bei 157-160° (Lit. [50]: 162-164°) schmelzenden voluminösen Niederschlag *) mit einer Ausbeute von 94% (6.5g).
$[\alpha]_D^{23}$: -26.0 ± 1° (c= 0.69 in Methanol).

$C_6H_{11}NO_3]Cl$ (180.6)

Ber.	C 39.91	H 6.14	N 7.76	Cl 19.63	OCH_3 17.18
Gef.+)	C 39.00	H 6.31	N 7.92	Cl 18.64	OCH_3 16.96

+) 8 Stdn. bei 45° i. Hochvak. getrocknet.

4-Hydroxy-L-prolin-benzylester-hydrochlorid [50]: Zu 16.0 g (122.0 mMol) 4-Hydroxy-L-prolin gab ich 240 ccm Benzylalkohol. Es wurde 1.5 Stdn. lang unter Eiskühlung getrocknetes Salzsäuregas eingeleitet. Die Lösung färbte sich dabei rot. Bei 100° wurde i. Vak. das Reaktionswasser abdestilliert. Nach Abkühlung wurden erneut 100 ccm Benzylalkohol hinzugegeben und der Veresterungsschritt wiederholt. Der unlösliche Rückstand wurde abfiltriert und die abgekühlte Reaktionslösung unter Rühren in 1 Liter

*) Trocknung bei 95° i. Hochvak. führt zur Sublimation. Das Sublimat ist nicht mehr in Methanol löslich und hat einen Zers.-P. von 270°.

trockenen Äther gegeben. Im Eisschrank fiel das weiße Hydrochlorid aus. Dieses erwies sich NMR-spektrometrisch als ein Gemisch des gesuchten Esters und der Ausgangssubstanz. Zur Trennung des Gemisches wurde in wenig Wasser gelöst, mit Äther/Äthanol (1:1) überschichtet und festes K_2CO_3 hinzugegeben, bis die Kohlendioxid-Entwicklung aufhörte. Der freie Ester ließ sich in der organischen Phase (Äther/Athanol) abtrennen. Nach dem Einengen wurde mit 250 ccm trockenem Äther aufgenommen und getrocknetes Salzsäuregas eingeleitet. Das Hydrochlorid fiel als weißer Niederschlag an; 8stdg. Aufbewahren im Eisschrank machte die Fällung vollständig. Die Kristallisation erfolgte aus Methanol/Äther. Ich erhielt den bei 158° schmelzenden Ester (Lit. [50]: 147-150°) in Form von feinen farblosen, rechteckigen Nadeln mit einer Ausbeute von 6.8 g (22%).

$[\alpha]_D^{21}$: -35.4 ± 1.5° (c= 1.05 in Methanol).

$C_{12}H_{15}NO_3]Cl$ (256.7)

Ber. C 56.16 H 5.89 N 5.45 Cl 13.81

Gef.[+] C 55.93 H 6.00 N 5.49 Cl 13.96

[+] 8 Stdn. bei 95° i. Hochvak. getrocknet.

Formyl-D-valyl-4-hydroxy-L-prolin-benzylester : Zu 6.0 g (23.3 mMol) 4-Hydroxy-L-prolin-benzylester-hydrochlorid und 3.4 g (23.3 mMol) Formyl-D-valin (15) in 80 ccm Methylenchlorid gab ich 3.22 ccm Triäthylamin sowie bei 0° 5.15 g (25.0 mMol) DCC, in wenig Methylenchlorid gelöst. Es wurde 2 Stdn. bei 0° und 15 Stdn. bei 20°

gerührt. Der gebildete Harnstoff (DCCH) wurde abfiltriert. Die organische Phase wurde je zweimal mit n HCl, n $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen. Die Waschlösungen wurden jeweils mit Methylenchlorid rückextrahiert. Der i. Vak. erhaltene Eindampfrückstand der vereinigten Methylenchloridphasen wurde in wenig Aceton gelöst und 1 Stde. im Eisschrank aufbewahrt. Der auskristallisierte restliche Harnstoff wurde abgesaugt. Nach dem Eindampfen erhielt ich 4.8 g (Ausb. 60 %) Ester als weißen Schaum, der über KOH getrocknet wurde. Zur Charakterisierung wurde ein Teil der Substanz dünnschichtchromatographisch (LS III) gereinigt.

$[\alpha]_D^{20}$: +1.4 ± 0.2° (c= 2.0 in absol. Äthanol).

$C_{18}H_{24}N_2O_5$ (348.4) Ber. C 62.06 H 6.94 N 8.04

Gef.+) C 62.01 H 6.92 N 8.03

+) 8 Stdn. bei 45° i. Hochvak. getrocknet.

Benzyloxycarbonyl-D-valin-p-nitrophenylester (54) [35,44]:

16.2 g (64.5 mMol) 47 und 10.8 g (77.5 mMol) p-Nitrophenol wurden in 100 ccm Methylenchlorid gelöst und unter Rühren bei 0° mit 14.2 g (68.0 mMol) DCC versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde vor Lichteinwirkung geschützt. Nach 30 Min. bei 0° wurde noch 1 Stde. bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Harnstoff (DCCH) wurde abgesaugt und die Lösung eingedampft. Aus wenig Benzol kristallisierten i. Eisschrank nicht umgesetztes p-Nitrophenol und DCCH aus. Der Niederschlag wurde abgesaugt und das Filtrat mit 1 n NaOH und Wasser gewaschen und i. Vak. eingeengt. Die eingeengte Lösung wurde an einer 3.2 x 25 cm-Säule aus Aluminiumoxid (I)

[W 200 basisch, "Woelm"] *) adsorbiert. Ich eluierte mit Benzol und Methanol. Die Methanol-Fraktion wurde nochmals aus Benzol an einer 3.2 x 14 cm-Säule aus Aluminiumoxid(I; W 200 basisch) adsorbiert und anschließend mit Benzol, Äthylacetat und Methanol eluiert. Die gelbe Methanol-Fraktion enthielt nach NMR-spektrometrischer Untersuchung nur noch p-Nitrophenol. Die vereinigten Benzol- und Äthylacetat-Fraktionen kristallisierten ohne Lösungsmittel und wurden über KOH getrocknet. Ich erhielt 15.0 g (63%) bei 63° schmelzendes 54 (Lit. [35]: 64-65°). $[\alpha]_D^{22}$: +24.1 ± 1° (c= 2.3 in Dimethylformamid).

$C_{19}H_{20}N_2O_6$ (372.4) Ber. C 61.28 H 5.41 N 7.52
Gef.+) C 61.21 H 5.35 N 7.40

+) 9 Stdn. bei 52° i. Hochvak. getrocknet.

N-Benzyloxycarbonyl-(O-tert.-butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (52):

Methode A: 7.18 g (27.1 mMol) Benzyloxycarbonyl-4-hydroxy-L-prolin [71] wurden in 60 ccm Methylenchlorid und 20 ccm Dioxan gelöst. Dann wurden 70 ccm über $CaCl_2$ getrocknetes und in einer Kühlfalle kondensiertes Isobuten sowie 0.27 ccm konz. Schwefelsäure hinzugegeben. Die Mischung wurde im zugeschmolzenen Bombenrohr 24 Stdn. bei Raumtemperatur geschüttelt, bis sie klar war. Anschließend wurde mit 50 ccm n $NaHCO_3$ neutralisiert und mit 200 ccm Äther extrahiert. Die dreimal mit je 50 ccm Wasser gewaschene Ätherphase wurde bei 40° i. Vak. eingedampft. Der Eindampf-

*) Beste Trennwirkung wurde bei 5 ccm Aluminiumoxid(I, W 200 basisch) pro mMol erzielt.

rückstand wurde aus Benzol an einer 2 x 7 cm-Aluminiumoxid-(IV)-säule adsorbiert. Das Benzol-Eluat, das die gesuchte Substanz (52) enthielt, wurde zweimal mit Wasser gewaschen und mehrmals mit Benzol p. a. abgedampft. Ausb. 6.6 g (76 %).

Methode B: 12.08 g (45.6 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-hydroxyprolin [71], 140 ccm tert.-Butylacetat und 6.8 g 0.1 n Perchlorsäure (150 mg pro mMol) wurden unter gelegentlichem Schütteln 5.5 Tage bei 20° aufbewahrt. Anschließend wurden 200 ccm Äthylacetat zugegeben, mit n $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen und mit Chloroform mehrmals abgedampft. Ich erhielt 16.8 g (98 %) 52 als farbloses Öl.
$[\alpha]_D^{21}$: -40.4 ± 1.5° (c= 3.95 in absol. Äthanol).
$C_{21}H_{31}N\,O_5$ (377.0) Ber. C 66.91 H 8.29 N 3.72
Gef.+) C 66.58 H 7.91 N 3.70

+) 6 Stdn. bei 35° i. Hochvak. getrocknet.

(O-tert.-Butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (55)
12.3 g (32.6 mMol) 52 wurden in 300 ccm Methanol p. a. gelöst und mit 0.7 g 10proz. Pd/A-Kohle aushydriert. Die Pd/A-Kohle wurde abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Nach Trocknung an der Ölpumpe erhielt ich ein farbloses kristallisierendes Öl mit einer Ausbeute von 7.3 g (92 %).
$[\alpha]_D^{20}$: -32.0 ± 1.5° (c= 1.28 in Methanol). Schmp. 212°.
$C_{13}H_{24}NO_3$ (242.3) Ber. C 64.43 H 9.98 N 5.78
Gef.+) C 64.12 H 9.80 N 5.72

+) 7 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

Benzyloxycarbonyl-D-valyl-(O-tert.-butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (57): Eine Lösung von 10.9 g (44.8 mMol) 55 und 15.0 g (40.3 mMol) Benzyloxycarbonyl-D-valin-p-nitrophenylester (54) in 100 ccm Methylenchlorid wurde drei Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurde mit 0.5 n NaOH und mehrmals mit Wasser gewaschen. Der gelbölige Eindampfrückstand der organischen Phase wurde aus Benzol an einer 3.2 x 28 cm-Aluminiumoxid-(I)-säule (W 200 basisch, "Woelm") adsorbiert. Die Eluate mit Benzol, Äthylacetat und Methanol ergaben folgende Mengen: Benzol-Fraktion 3.9 g, Äthylacetat-Fraktion 6.9 g, Methanol-Fraktion 6.8 g. Die Methanol-Fraktion wurde nochmals aus Äthylacetat an einer 3.2 x 9 cm-Aluminiumoxid-(I)-säule (W 200 basisch) adsorbiert. Nachwaschen mit Äthylacetat lieferte noch 3.1 g gute Substanz. Die vereinigten Äthylacetat- und Benzol-Fraktionen wurden eingedampft, in Chloroform aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Der mit Aceton mehrmals abgedampfte Eindampfrückstand kristallisierte aus Äthylacetat/Cyclohexan (1:1). Nach Umkristallisation erhielt ich 57 mit einer Ausbeute von 13.1 g (69%) in Form von feinen, farblosen Nadeln. $[\alpha]_D^{20}$: -12.4 ± 0.3° (c= 1.55 in Methanol). Schmp. 125°.

$C_{26}H_{40}N_2O_6$ (475.6) Ber. C 65.74 H 8.48 N 5.90

Gef.+) C 65.63 H 8.40 N 5.95

+) 6 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

D-Valyl-(O-tert.-butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (59): 9.6 g (20.2 mMol) 57 wurden in 300 ccm Methanol p. a. gelöst und mit 0.4 g 10proz. Pd/A-Kohle hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung i. Vak. eingedampft. Nach Trocknung an der Ölpumpe erhielt ich 6.7 g (99 %) 59 als farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{18}$: -72.3 ± 0.5° (c= 1.86 in Methanol).

$C_{18}H_{34}N_2O_4$ (342.5) Ber. C 63.12 H 10.01 N 8.18

Gef.+) C 63.00 H 9.73 N 8.21

+) 8 Stdn. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonin-benzylester (50)[14]: 27.4 g (125.0 mMol) N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-threonin (46)[64] wurden in 47.5 g (375.0 mMol) Benzylchlorid gelöst, mit 19.0 g (187.5 mMol) Triäthylamin versetzt und auf 75° am Rückflußkühler erhitzt. Nach 15 Min. wurden nochmals 15.8 g (125.0 mMol) Benzylchlorid und 6.32 g (62.5 mMol) Triäthylamin zugegeben und 1 Stde. auf 75° erhitzt. Nach Erkalten wurde der feste Rückstand in 150 ccm H_2O und 200 ccm Äther gelöst. Die wäßr. Phase wurde mehrmals mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden einmal mit 1 m Citronensäure, zweimal mit n $NaHCO_3$ und dreimal mit Wasser gewaschen. Der Eindampfrückstand wurde aus Benzol an vier 3.6 x 40 cm-Säulen aus Aluminiumoxid (II - III) ("Merck") adsorbiert. Nachwaschen mit 200 ccm Benzol eluierte nicht umgesetztes Benzylchlorid. Die gesuchte Substanz (50) erhielt ich als farbloses Öl durch Eluieren

mit Äthylacetat. Ausb. 31.3 g (90 %).
$[\alpha]_D^{20}$: -21.8 ± 2° (c= 3.2 in Methanol; Lit.[14]: -19.6°).

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-(benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valyl)-L-threonin-benzylester (53) : Zu einer gerührten Lösung von 31.5 g (118.7 mMol) Benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin (18)[37] in 90 ccm Tetrahydrofuran gab ich bei -7° 16.4 ccm (118.7 mMol) Triäthylamin und 15.5 ccm (118.7 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester. Nach ca. einer halben Min. wurde eine vorgekühlte Lösung von 37.8 g (118.7 mMol) 50 in 80 ccm Tetrahydrofuran hinzugegeben. Die Mischung wurde 16 Stdn. bei -7° gerührt und anschließend filtriert. Das Tetrahydrofuran wurde i. Vak. abgezogen und der Rückstand in 400 ccm Chloroform aufgenommen. Ich wusch die organische Phase zweimal mit 1 m Citronensäure, zweimal mit n $NaHCO_3$ und zweimal mit Wasser. Der Eindampfrückstand war ein farbloses Öl (82.5 g), das aus Benzol an sieben 3.2 x 20 cm-Säulen aus neutralem Aluminiumoxid (III; "Woelm")*) adsorbiert wurde. Nachwaschen mit weiterem Benzol eluierte die gesuchte Substanz 53 , mit Äthylacetat wurde nicht umgesetztes 50 eluiert. Nach Eindampfen der Benzol-Fraktionen erhielt ich ein farbloses Öl (40.0 g), das aus Benzol an fünf 3.2 x 30 cm-Kieselgelsäulen (0.05 - 0.2 mm; "Merck")**) chromatographiert wurde. Nachwaschen mit Benzol entfernte restliche Nebenprodukte.

---

*) Optimale Trennungen wurden mit 20 ccm Aluminiumoxid (III; "Woelm") pro mMol erreicht.

**) Gute Trennwirkung mit 15 ccm Kieselgel pro mMol.

Die sehr saubere Substanz befand sich im Äthylacetat-Eluat, das zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend filtriert wurde. Der Eindampfrückstand ergab 27.6 g (42 %) 53 als farbloses Öl, das nach längerer Zeit zu einer weißen gummiartigen Masse erstarrte.

$[\alpha]_D^{20}$: -27.7 ± 2° (c= 5.5 in absol. Äthanol).

$C_{30}H_{40}N_2O_8$ (556.0) Ber. 64.75 H 7.19 N 5.04

Gef.+) 64.66 H 7.18 N 5.01

+)6 Stdn. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-(N-methyl-L-valyl)-L-threonin (56)[58]: 27.6 g (49.7 mMol) 53 wurden in 300 ccm Methanol gelöst und mit 0.7 g 10proz. Pd/A-Kohle hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Ich erhielt 56 als weißen Schaum, der über KOH getrocknet wurde. Ausb. 13.8 g (84 %).

Das bei 102 - 110° schmelzende 56 hatte eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: +32.7 ± 2° (c= 1.27 in Methanol; Lit.[58]: +57.1°) und ein Äquiv.-Gew.++) von 330.

$C_{15}H_{28}N_2O_6$ (332.4) Ber. C 54.20 H 8.49 N 8.43

Gef.+) C 54.17 H 8.56 N 8.42

+)9 Stdn. bei 95° i. Hochvak. getrocknet.

++)Potentiom. Titration mit 0.1 n NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

Benzyloxycarbonyl-sarkosin-succinimidester (49): 25.23 g (113.2 mMol) Benzyloxycarbonyl-sarkosin (45) [66] und 13.0 g (113.2 mMol) N-Hydroxysuccinimid wurden in 300 ccm Dioxan gelöst und bei 0° unter Rühren mit 24.3 g (118.0 mMol) DCC, in wenig Dioxan gelöst, versetzt. Die Mischung wurde 14 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Der Harnstoff (DCCH) wurde abgesaugt und das Dioxan i. Vak. abgedampft. Aus dem mit wenig Aceton aufgenommenen Rückstand kristallisierte im Eisschrank restlicher Harnstoff aus, der abfiltriert wurde. Als Eindampfrückstand erhielt ich ein goldgelbes, dickflüssiges Öl, das zum Teil aus Äthylacetat/Petroläther kristallisierte. Ich erhielt den bei 75° schmelzenden Ester (49) mit einer Ausbeute von 35.5 g (97%).

$C_{15}H_{16}N_2O_6$ (320.3) Ber. C 56.25 H 5.03 N 8.75
Gef.[+] C 56.13 H 4.79 N 8.77

[+] 16 Stdn. bei 45° i. Hochvak. getrocknet.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-(benzyloxycarbonyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl)-L-threonin (58) [58]: Zu einer Lösung von 6.3 g (28.0 mMol) Benzyloxycarbonyl-sarkosin (45) in 40 ccm Tetrahydrofuran wurden bei -10° und unter Rühren 3.12 ccm (28.0 mMol) N-Methylmorpholin und 3.66 ccm (28.0 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester gegeben. Nach 1.5 Min. gab ich 2.61 ccm (23.5 mMol) N-Methylmorpholin und eine vorgekühlte Lösung von 7.8 g (23.5 mMol) 56 in 100 ccm Dimethylformamid hinzu. Es wurde 1 Stde. bei -10°

und 24 Stdn. bei -7° gerührt. Die Lösung wurde filtriert und bei 60° i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in Äthylacetat aufgenommen und jeweils zweimal mit 1 m Citronensäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Waschlösungen wurden jeweils mit Äthylacetat rückextrahiert. Die organischen Phasen wurden eingedampft und ergaben ein gelbes Harz (13.9 g). Dieses wurde aus Methanol an 14 3.5 x 190 cm-Säulen aus Sephadex LH 20 chromatographiert. Ich erhielt 58 als weißen Schaum mit einer Ausbeute von 6.9 g (50 %) und einem Äquiv.-Gew.++) von 550.
$[\alpha]_D^{20}$: -53.0 ± 2° (c= 1.3 in Methanol; Lit.[58]: -59.7°).
$C_{26}H_{39}N_3O_{11}$ (537.6) Ber. C 58.04 H 7.25 N 7.81
Gef.+) C 58.23 H 7.32 N 7.78

+) 8 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.
++) Potentiom. Titration mit 0.1 n NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O_{Thr}-(benzyloxycarbonyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl)-L-threonyl-D-valyl-(O-tert.-butyl)-4-hydroxy-L-prolin-tert.-butylester (60): Zu einer gerührten Lösung von 6.7 g (12.45 mMol) 58 in 100 ccm Tetrahydrofuran wurden bei -10° 1.38 ccm (12.45 mMol) N-Methylmorpholin und 1.62 ccm (12.45 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester hinzugegeben. Nach 1 Min. erfolgte die weitere tropfenweise Zugabe von vorgekühltem 4.45 g (13.0 mMol) 59 gelöst in 50 ccm Tetrahydrofuran. Es wurde 2 Stdn. bei -10° und 15 Stdn. bei +7° gerührt. Der Nieder-

schlag wurde abgesaugt und die organische Phase i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde mit 300 ccm Äthylacetat aufgenommen und jeweils zweimal mit 1 m Citronensäure, n $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen. Der Eindampfrückstand wurde aus Benzol an einer 3.2 x 20 cm-Säule aus neutralem Aluminiumoxid(III, "Woelm") adsorbiert. Es wurde mit Benzol, Äthylacetat und Methanol eluiert: Benzol-Fraktion 3.5 g, Äthylacetat-Fraktion 7.2 g, Methanol-Fraktion 1.1 g. Reines 60 befand sich, NMR-spektrometrisch bestimmt, nur in der Äthylacetat-Fraktion. Der Eindampfrückstand der Benzol-Fraktion wurde nochmals aus Methanol an drei 3.5 x 190 cm-Säulen aus Sephadex LH 20 chromatographiert. Hierdurch erhielt ich nochmals 2.7 g 60 in Form von weißem Schaum. Schmp. 70-76°. Ausbeute: 9.8 g (92%).

$[\alpha]_D^{20}$: -30.3 ± 2° (c= 1.15 in Methanol).

$C_{44}H_{71}N_5O_{12}$ (862.0) Ber. C 61.29 H 8.31 N 8.12

Gef.+) C 60.84 H 8.44 N 7.88

+)6 Stdn. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

C-(Benzyloxycarbonyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl)-L-threonyl-D-valyl-4-hydroxy-L-prolin-trifluoracetat (61):

4.4 g (5.12 mMol) 60 wurden in 50 ccm 70proz. Trifluoressigsäure gelöst und bei Raumtemperatur 36 Stdn. aufbewahrt. Der Eindampfrückstand wurde mehrmals mit Wasser und anschließend mit Äther abgedampft. Ich erhielt ein weißes Pulver, das schichtchromatographisch auf Kieselgel (LS II) gereinigt und über KOH getrocknet wurde. Das bei 112-117°

schmelzende 61 erhielt ich mit einer Ausbeute von 3.3 g (84%). $[\alpha]_D^{20}$: -38.0 ± 2° (c= 1.05 in Methanol).

$C_{31}H_{47}N_5O_{10}]CF_3COOH$ (763.8)

Ber. C 51.89 H 6.33 N 9.17

Gef.+) C 51.94 H 6.78 N 9.00

+) 8 Stdn. bei 93° i. Hochvak. getrocknet.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-O_{Thr}-(benzyloxycarbonyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl)-L-threonyl-D-valyl-4-hydroxy-L-prolin (65): 1.13 g (3.93 mMol) über KOH getrocknetes und kristallisiertes 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoylchlorid (64) [4] wurden in 20 ccm Tetrahydrofuran gelöst und zu 3.0 g (3.93 mMol) 61, das in 100 ccm Tetrahydrofuran/Äther (1:1) gelöst und mit 0.87 ccm N-Methylmorpholin neutralisiert war, gegeben. Unter Rühren wurden bei 0° weitere 0.44 ccm N-Methylmorpholin hinzugetropft. Es wurde noch 3.5 Stdn. bei 0° gerührt. Tetrahydrofuran und Äther wurden i. Vak. abgezogen, dann der Rückstand mit 300 ccm Äthylacetat gelöst und dreimal mit n HCl sowie viermal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Äthylacetatphase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. eingedampft. Den erhaltenen über KOH getrockneten gelblichen Schaum (3.1 g) chromatographierte ich aus Methanol an drei 3.5 x 190 cm-Säulen aus Sephadex LH 20. Nach dem UV-Detektor erhielt ich vier Fraktionen, wovon die letzten beiden aufgrund NMR-spektrometrischer Messungen verworfen werden konnten. Die zweite Fraktion wurde auf Kieselgel-

platten (LS III) schichtchromatographisch gereinigt. Die unterste der vier auf den Platten gebildeten Zonen wurde jeweils herausgeschabt, die Substanz mit Methanol eluiert, eingedampft, mit Chloroform aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Der Eindampfrückstand wurde nochmals auf Kieselgelplatten (LS IV) schichtchromatographisch gereinigt. Nach obiger Aufarbeitung erhielt ich bei 110-112° schmelzendes 65 als gelblichen Schaum mit einer Ausbeute von 614 mg (17%). $[\alpha]_D^{20}$: -1.8 ± 0.2° (c= 0.67 in Methanol).

$C_{46}H_{57}DN_6O_{14}$ (920.0) Ber. C 60.05 H 6.24 N 9.13

Gef.+) C 58.37*) H 6.65 N 8.96

+) 17 Stdn. bei 95° i. Hochvak. getrocknet.

Oxidative Selbstkondensation von 65 zu Bis-seco(hyp,sar)-[8-deutero-(3'$_{\alpha\,\beta}$-hyp)-actinomycin C_1](40): 60 mg (0.0652 mMol) 65 wurden in 50 ccm Methanol gelöst und mit 0.1 g 10proz. Pd/A-Kohle hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 50 ccm Methanol/0.07 m Phosphatpuffer pH 7.2 (1:1) gelöst. Der pH-Wert ging beim Zusammengeben von Methanol und Pufferlösung sofort auf pH 8.4. Er wurde vor dem Lösen des Hydrierrückstandes mit 2 n HCl auf pH 7.2 eingestellt. Unter Rühren erfolgte bei 20° mit 64 mg in wenig Puffer gelöstem Kaliumhexacyanoferrat (III) die Oxidation. Nach 15stdg. Rühren bei pH 7.2 (evtl. Nachregulierung mit 0.2 n NaOH) wurde die rote Lösung mit 100 ccm Wasser verdünnt, mit 2 n HCl angesäuert und mit Chloroform/Butanol (3:1) extrahiert. Der Eindampfrückstand wurde aus Chloroform/

*) Hartnäckige Chloroformeinschlüsse.

Aceton/Methanol (8:2:1) an einer 2 x 15 cm sauren Kieselgelsäule chromatographiert. Nebenprodukte wusch ich mit Chloroform/Aceton (4:1) von der Säule. Das rote Peptolid ließ sich mit Methanol eluieren. Der in Wasser gelöste Eindampfrückstand wurde mit Chloroform/Butanol (3:1) reextrahiert. Anschließend wurde die wäßr. Phase auf pH 5 mit 2 n HCl angesäuert und mit Butanol extrahiert. Diese org. Phase wurde filtriert und eingedampft. Ich erhielt 65 als papierchromatographisch (LS VIII) einheitlichen Eindampfrückstand mit der Ausbeute von 5 mg (12 %) und einem R_F= 0.44 +). $[\alpha]_D^{20}$: -69.0 ± 3° (c= 0.2 in Methanol).

+)Bezogen auf Bis-seco-actinomycin C_1 70)= 1.0 (LS IX).

Oxidative Mischkondensation von 36 und 37a zu Actinomycin C_1 (10), (ß)-Seco(hyp,sar)-(3'ß-hyp)-actinomycin C_1 (38), (∝)-Seco(hyp,sar)-[8-deutero-(3'∝-hyp)-actinomycin C_1] (39) sowie Bis-seco(hyp,sar)-[8-deutero-(3'∝ß-hyp)-actinomycin C_1] (40) (vgl. S. 69): Das aus 500 mg (0.66 mMol) 35 9) und 775 mg (0.842 mMol) 37b (Verhältnis 1:1.55) durch Hydrierung mit 10proz. Pd/A-Kohle in 150ccm Methanol entstandene 36/37a-Gemisch wurde nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen zur Trockene in 80 ccm Methanol/0.07 m Phosphatpuffer pH 7.2 (1:1) gelöst und mit 1.688 g in wenig Puffer gelöstem Kaliumhexacyanoferrat (III) bei 20° und pH 7.2 (mit ca. 15 ccm 0.2 n NaOH sofort nachreguliert) oxidiert. Nach 15stdg. Rühren bei 20° extrahierte ich die mit 2 n HCl auf pH 5 angesäuerte Lösung

mit Butanol. Der Extrakt wurde mit angesäuertem (2n HCl) Wasser dreimal gewaschen und der Eindampfrückstand (1.14g) an einer 4 x 110 cm-Zellulosesäule (LS VIII, Laufzeit 5 Tage) chromatographiert. Auf der Säule erfolgte eine Trennung in sechs Zonen (I - VI; Bezifferung in Richtung abnehmender R_F-Werte).

Der am schnellsten die Zellulosesäule durchwandernden Fraktion I wurde mit $NaHCO_3$ die Kresotinsäure entzogen. Anschließend wurde die organische Phase mit Wasser gewaschen und der Eindampfrückstand aus wenig Chloroform an einer 2 x 10 cm-Aluminiumoxid-(IV)-säule adsorbiert. Nachwaschen mit Chloroform entfernte farblose Nebenprodukte. Das rote Actinomycin ließ sich mit Äthylacetat eluieren. Aus der filtrierten, mit Wasser gewaschenen und eingedampften Äthylacetat-Fraktion kristallisierte das Actinomycin C_1 (10) aus Äthylacetat/Cyclohexan in Form roter spitzer Nadeln. Nach 14stdg. Trocknung i. Hochvak. bei 100° waren Drehwert, R_F-Wert, NMR-Spektrum, Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt identisch mit den Daten von nativem Actinomycin C_1.

10 (Zone I): 45 mg , Schmp. 244-246°.

$[\alpha]_D^{20}$: -321.0 ± 10° (c= 0.26 in Methanol).

Zone II, die in einigem Abstand von Zone I die Zellulosesäule ebenfalls durchwanderte, wurde nach Aufarbeitung wie die Zone I aus Chloroform/Aceton (4:1) an einer 2 x 15 cm sauren Kieselgelsäule chromatographiert, da eine Probe auf Aluminiumoxid(IV) auch mit Methanol nicht mehr zu

eluieren war. Nebenprodukte wurden mit 400 ccm Chloroform/Aceton (4:1) und der rote Inhaltsstoff mit Methanol eluiert. Der Eindampfrückstand wurde in Chloroform/Butanol (1:1) gelöst, zweimal mit angesäuertem (2 n HCl) Wasser gewaschen, filtriert, eingedampft und aus wenig Chloroform mit n-Pentan im Zentrifugenglas gefällt. Das erhaltene amorphe gelbe Pulver (36 mg) war papierchromatographisch (LS IX) uneinheitlich, hatte mit ε= 12490 (445) eine zu kleine Molextinktion und erwies sich daher als Nebenprodukt.

Die Wasser/Methanol-Eluate der aus der Zellulosesäule herausgeschnittenen Zonen III und IV wurden mit Chloroform extrahiert und dreimal mit angesäuertem (2 n HCl) Wasser gewaschen. Die Eindampfrückstände wurden aus Chloroform/Aceton (4:1) an je einer 2 x 14 cm sauren Kieselgelsäule chromatographiert und wie Zone II weiter aufgearbeitet. Die Fällungsprodukte waren gelbrote amorphe Pulver.

38 oder 39 (Zone III): 125 mg , Schmp.(Zers.) 202 - 212°. $[\alpha]_D^{20}$: -100.0 ± 3° (c= 0.28 in Methanol) +).

+) 10 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

Der Inhaltsstoff der Zone IV (45 mg) erwies sich im 30 cm-Papierrundchromatogramm (LS IX) als Zweikomponentengemisch. Die Wasser/Methanol-Eluate der Zonen V und VI wurden mit Butanol extrahiert und die Extrakte mit angesäuertem (2 n HCl) Wasser gewaschen. Der Eindampfrückstand von Zone V wurde aus Chloroform/Aceton (4:1) und

der von Zone VI aus Chloroform/Aceton/Butanol (40:10:1) an je einer 2 x 16 cm sauren Kieselgelsäule chromatographiert. Die weitere Aufarbeitung beider Zonen erfolgte wie bei Zone II beschrieben. Fällungsprodukt der Zone V war ein rotes amorphes Pulver.

38 oder 39 (Zone V): 104 mg , Schmp. (Zers.) 197-205°.
$[\alpha]_D^{19}$: -119.5 ± 3° (c= 0.17 in Methanol) +).

+) 10 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

Die Fällung des Inhaltsstoffes der Zone VI gelang aus wenig Methanol und viel Äthylacetat durch langsames Eindampfen bei 40° i. Vak.. Das orange-farbene Pulver erwies sich papierchromatographisch (LS IX) - ebenso wie die in der Oberphase des Zellulosesäulesystems (LS VIII) ungelöste Restsubstanz (263 mg) - als Zweikomponentengemisch. Da eine dieser beiden Komponenten das Actinocinylpeptid 40 sein mußte, wurde der Inhaltsstoff der Zone VI (69 mg) zusammen mit der ungelösten Restsubstanz aus 40 ccm Oberphase nochmals an einer 3.5 x 68 cm-Zellulosesäule (LS IX; Laufzeit 5 Tage) chromatographiert. Auf der Säule erfolgte eine Trennung in fünf Zonen, von denen die mit kleinstem und größtem R_F-Wert intensiver rot gefärbt waren und wie oben aufgearbeitet wurden. Der Inhaltsstoff der untersten Zone, also der mit dem größten R_F-Wert, ergab im 30 cm-Papierrundchromatogramm (LS IX) ein verschmiertes Zonengemisch. Das Produkt mit dem kleinsten R_F-wert war einheitlich, lief mit dem aus der Selbstkondensation von 37a erhaltenen 40 gleich und zeigte auch dessen optische Drehung.

40 (Zone VI): 17 mg , Schmp. (Zers.) 188 - 194°.
$[\alpha]_D^{22}$: -70.5 ± 3° (c= 0.13 in Methanol) +).

+)24 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

Cyclisierungsversuche zu Actinomycin $X_{o\beta}$ (41) [27] und 8-Deutero-actinomycin i-$X_{o\beta}$ (42): a) Absolutierung des Lösungsmittels: In Tetrahydrofuran (reinst) wurde so lange Natriumdraht gepreßt, bis neu eingepreßtes Natrium seinen Oberflächenglanz behielt und keine weitere Gasentwicklung stattfand. In einer bei 150° ausgeheizten Apparatur, die durch ein Phosphorpentoxidrohr gegen Feuchtigkeits-einfluß geschützt und mit Aluminiumfolie umkleidet war (Lichtausschluß), wurde das vorgereinigte Tetrahydrofuran über Lithium-aluminiumhydrid (2 g auf 250 ccm) 6 Stdn. am Rückfluß gekocht und in eine Vorlage destilliert, aus der es sofort weiterverwendet wurde.
b) Cyclisierung: 50 mg (0.0386 mMol) 38 bzw. 39 (Zone III) und 75 mg (0.0576 mMol) 39 bzw. 38 (Zone V) wurden in je 50 ccm absol. Tetrahydrofuran gelöst und rasch mit 100 mg bzw. 150 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Die Lösungen wurden 1 Tag unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluß gerührt und 2 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Abdampfung des Tetrahydrofurans wurden die Rohprodukte aus wenig Chloroform mit Petroläther gefällt und, in Chloroform gelöst, jeweils zweimal mit 1 n HCl, n $NaHCO_3$ und angesäuertem Wasser gewaschen. Die Eindampfrückstände wurden in wenig Aceton

gelöst und bei 6° einige Stdn. im Eisschrank aufbewahrt. Der auskristallisierte Harnstoff (DCCH) wurde abfiltriert und die roten Eindampfrückstände jeweils aus 20 ccm Oberphase an je einer 3.5 x 48 cm-Zellulosesäule (LS XI) chromatographiert. Auf den Säulen erhielt ich eine Trennung in jeweils zwei Zonen (o= kleiner R_F-Wert; u= großer R_F-Wert).

Ausbeuten: III o —— 12 mg; V o —— 9 mg
III u —— 10 mg; V u ——14 mg.

Anhand der ähnlichen NMR-Spektren war eine Zuordnung der einzelnen Zonen nicht möglich. Zudem war keines dem NMR-Spektrum von Actinomycin $X_{oß}$ (Abb. 17) äquivalent. Alle Zoneninhaltsstoffe zeigten auf Agar-Platten biologische Aktivität gegen Bac. subtilis.

Ich danke Herrn Dr. G. Remberg für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn M. Beller für die Durchführung der Mikroanalysen, Frau E. Salkowski, Herrn U. Leonhardt und Fräulein P. Drewke für die Messung der NMR-Spektren sowie Frau M. Lackner für die mikrobiologischen Teste.

Für wissenschaftlichen Unterricht danke ich meinen akademischen Lehrern, den Herren
Prof. Dr. W.A. Bingel, Prof. Dr. P. Boldt,
Prof. Dr. Dr. e.h. H. Brockmann, Prof. Dr. A. Flammersfeld,
Prof. Dr. O. Glemser, Prof. Dr. Dr. A. Haas,
Prof. Dr. R. Hilsch, Prof. Dr. W. Jost,
Privatdozent Dr. H. Lackner, Prof. Dr. W. Lüttke,
Prof. Dr. A. Müller, Prof. Dr. U. Schöllkopf,
Prof. Dr. E. Schwarzmann, Prof. Dr. G. Spiteller,
Prof. Dr. W. Seubert, Prof. Dr. H.G. Wagner,
Prof. Dr. M. Ziegler.

VI. Literaturverzeichnis

1) S.A. Waksman und H.B. Woodruff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 609 (1940).

2) C. Hackmann, Z. Krebsforsch. 58, 607 (1952)
60, 250 (1954)
Strahlentherapie 90, 296 (1953)
Med. Klin. 49, 1539 (1954).

3) G. Schulte, Z. Krebsforsch. 58, 500 (1952)
Strahlentherapie 94, 491 (1954).

4) H. Brockmann und H. Muxfeldt, Chem.Ber. 91, 1242 (1958).

5) F. Seela, Dissertat. Univ. Göttingen (1967).

6) F. Seela, J. Med. Chem. 15, 684 (1972).

7) H. Brockmann und F. Seela, Chem. Ber. 104, 2751 (1971).

8) E. Schulze, Dissertat. Univ. Göttingen (1970).

9) H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. 101, 1312, 2231 (1968).

10) W. Schramm, Dissertat. Univ. Göttingen (1967).

11) E. Atherton und J. Meienhofer, J. Amer. chem. Soc. 94, 4759 (1972).

12) E. Atherton, R.P. Patel, Y. Sano und J. Meienhofer, J. Med. Chem. 16, 355 (1973).

13) H. Brockmann und E.A. Stähler, Tetrahedron Letters [London] 1973, 2567.

14) C.W. Mosher und L. Goodman, J. Org. Chem. 37, 2928 (1972).

15) H. Lackner, Chem. Ber. 103, 2476 (1970).

16) W. Müller und D.M. Crothers, J. Mol. Biol. 35, 251 (1968).

17) S.C. Jain und H.M. Sobell, J. Mol. Biol. 68, 1 (1972).

18) H. Brockmann, W. Müller und H. Peterssen-Borstel, Tetrahedron Letters [London] 1966, 3531.

19) H. Brockmann, J. Ammann und W. Müller, Tetrahedron Letters [London] 1966, 3595.

20) H. Lackner, Tetrahedron Letters [London] (1975), im Druck.

21) H.M. Sobell, S.C. Jain, T.D. Sakore und C.E. Nordmann, Nature 231, 200 (1971).

22) H. Lackner, Chemistry and Biology of Peptides (ed. J. Meienhofer) S. 147, Ann Arbor Science Publishers 1972.

23) H. Lackner, Angew. Chem. (1975), im Druck.

24) H. Brockmann und G. Pampus, Angew. Chem. 67, 519 (1955).

25) H. Brockmann, G. Pampus, J.H. Manegold, Chem. Ber. 92, 1294 (1959).

26) H. Brockmann, H. Linge, H. Gröne, Naturwissenschaften 40, 224 (1953).

27) H. Brockmann und J.H. Manegold, Chem. Ber. 93, 2971 (1960).

28) H. Brockmann, Cancer Chemotherapy Reports 58, 9 (1974).

29) H. Lackner, Tetrahedron Letters [London] 1964, 3517.

30) P.De Santis, R. Rizzo, G. Ughetto, Nature 237, 94 (1972).

31) E. Schäfer, Diplomarbeit, Univ. Göttingen (1971).

32) A. Plattner, K. Vogler und P. Quitt, Helv. chim. Acta 46, 327 (1963).

33) H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. 100, 353 (1967).

34) R.W. Roeske, Chem. Ind. 1959, 1121.

35) J. Meienhofer, J. Org. Chem. 1967, 1143.

36) E. Taschner, A. Chimiak, B. Bator, T. Sokolowska, Ann. Chem. Liebigs 646, 134 (1961).

37) A. Plattner, K. Vogler, R.O. Studer, P. Quitt, W. Keller-Schierlein, Helv. chim. Acta 46, 927 (1963).

38) G. Schwoerer, Dissertat. Univ. Göttingen (1973).

39) G. Katsoyannis, J. Amer. chem. Soc. 83, 4053 (1961).

40) P. Marsh und L. Goodman, Can. J. Chem. 44, 799 (1966).

41) R.B. Woodward, R.A. Olofson und H. Mayer, J. Amer. chem. Soc. 83, 1010 (1961).

42) H. Brockmann und J.H. Manegold, Chem. Ber. 100, 3814 (1967).

43) D. Chillemi, L. Scarso und E. Scoffone, Gazz. chim. Ital. 87, 1356 (1957).

44) M. Bodanzky und V.Du Vigneaud, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 (1959).

45) L. Velluz, G. Amiard und R. Heymès, Bull. Soc. Chim. 1955, 201.

46) W. Grassmann, E. Wünsch, P. Deufel und A. Zwick, Chem. Ber. 91, 538 (1958).

47) K. Okawa, J. chem. Soc. Japan 75, 1197 (1950).

48) K. Okawa, Bull. chem. Soc. Japan 29, 488 (1956).

49) M. Iwai, A. Uno, K. Nakajima, S. Hase, I. Takeuchi und K. Okawa, Bull. chem. Soc. Japan 43, 3246 (1970).

50) E.L. Smith und M. Bergmann, J. Biol. Chem. 153, 627 (1944).

51) E. Wünsch, Chem. Ber. 91, 542 (1958).

52) C. Eguchi und A. Kakuta, Bull. Chem. Soc. Japan 47, 1704 (1974).

53) H.D. Jakubke und H. Jeschkeit, Aminosäuren-Peptide-Proteine, S. 127, Akademie Verlag Berlin (1973).

54) D.S. Kemp, Proc. 11th Europ. Peptide Symp. Wien 1971, North-Holland Publishing Comp. Amsterdam 1972, im Druck.

55) E. Taschner, C. Wasielewski und J.F. Biernat, Ann. Chem. Liebigs 646, 119 (1961).

56) G.W. Anderson und F.M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. 82, 3362 (1960).

57) G.W. Anderson und F.M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. 82, 3359 (1960).

58) J. Meienhofer, J. Amer. chem. Soc. 92, 3771 (1970).

59) L.A. Carpino, C.A. Giza und B.A. Carpino, J. Amer. chem. Soc. 81, 955 (1959).

60) E. Schnabel, Ann. Chem. Liebigs 702, 188 (1967).

61) R. Schwyzer, P. Sieber und K. Kappeler, Helv. chim. Acta 42, 2622 (1959).

62) K. Hofmann, R. Schmiechen, R.D. Wells, Y. Wolman und N. Yanaihara, J. Amer. chem. Soc. 87, 611 (1965).

63) E. Wünsch und G. Wendlberger, Chem. Ber. 97, 2504 (1964).

64) E. Baer und F. Eckstein, J. Biol. Chem. 237, 1451 (1962).

65) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970).

66) D. Ben-Ishai und E. Katchalski, J. Amer. chem. Soc. 74, 3688 (1952).

67) G.W. Anderson, J.E. Zimmermann und F.M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. 86, 1839 (1964).

68) E. Schnabel, H. Klostermeyer, H. Berndt, Ann. Chem. Liebigs 749, 90 (1971).

69) R.G. Hiskey, L.M. Beacham, V.G. Matl, J.N. Smith, E.B. Williams, A.M. Thomas und E.T. Wolters, J. Org. Chem. 36, 488 (1971).

70) J. Ammann, Dissertat. Univ. Göttingen (1963).

71) W. Grassmann und E. Wünsch, Chem. Ber. 91, 455 (1958).

Lebenslauf

Als Sohn des Landwirtschaftsrates i.R. Dr. Gustav Schäfer und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Kuhlmey wurde ich, Eckhard Volkhard Schäfer, am 29. 5. 1943 in Lauenburg (Pommern) geboren.

Nach der Vertreibung aus dem Osten und einer 3jährigen Internierung in Dänemark gelangte ich nach Ebstorf (Kreis Uelzen). Ostern 1949 wurde ich hier eingeschult. Wegen der Versetzung meines Vaters wechselte ich auf die Volksschule in Uelzen. Ab 1954 besuchte ich hier das Herzog-Ernst-Gymnasium, das ich im Februar 1963 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Im Anschluß an meine zweijährige Wehrdienstzeit begann ich im Sommersemester 1965 an der Georg-August-Universität Göttingen das Studium der Chemie und bestand dort nach Abschluß der Grundpraktika am 20. 4. 70 das Diplom-Vorexamen. Danach arbeitete ich unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Lackner an meiner Diplomarbeit mit dem Titel "Synthese von (α_{na},ß-enantio)- und ($ß_{na}$, α-enantio)-Actinomycin C_1" und legte am 29. 10. 71 das Diplom-Hauptexamen ab.

Seitdem arbeitete ich, ebenfalls unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Lackner, an der vorliegenden Dissertation.